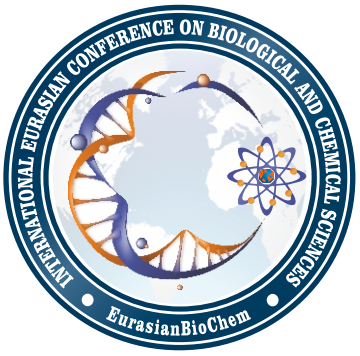



3rd INTERNATIONAL EURASIAN CONFERENCE ON

# BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES

(EurasianBioChem 2020)

19 - 20 March 2020

Ankara / Turkey

www.eurasianbiochem.org

# PROCEEDING BOOK

EurasianBioChem

ISBN: 978-605-69426-1-7

3rd International Eurasian Conference on

# Biological and Chemical Sciences

(EurasianBioChem 2020)

March 19-20, 2020 / Ankara, Turkey

# PROCEEDING BOOK

**Editors**

Prof. Dr. Muhittin DOĞAN

Assoc. Prof. Dr. Erol ATAY

**Copyright © 2020**

**ISBN:** 978-605-69426-1-7

**Publication Date:** June 2020

All rights reserved. The right to publish this book belongs to EurasianBioChem 2020. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without permission. This Proceeding Book has been published as an electronic publication (e-book). Citation can not be shown without the source, reproduced in any way without permission.

**Authors are responsible for the contents of their papers.**

**Congress Web Page**

www.eurasianbiochem.org

**E-mail**

info@eurasianbiochem.org

**CHAIRMAN OF CONFERENCE**

| | |
|---|---|
| **Prof. Dr. Muhittin DOĞAN** | **Gaziantep University, Turkey** |

**ORGANIZING COMMITTEE**

| | |
|---|---|
| **Prof. Dr. Ahmed IMTIAJ** | **University of Rajshahi, Bangladesh** |
| **Prof. Dr. Ali BİLGİLİ** | **Ankara University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ** | **Mustafa Kemal University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ayten NAMLI** | **Ankara University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Güray UYAR** | **Ankara Hacı Bayram Veli University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ghassan Al. SAMARRAI** | **University of Samarra, Iraq** |
| **Prof. Dr. Mehmet Rüştü KARAMAN** | **Ankara University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Miloudi HLAIBI** | **University of Hassan II Casablanca, Morocco** |
| **Prof. Dr. Osman GÜLNAZ** | **Cukurova University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Rosa Maria ORRIOLS** | **International Comission Occupational Health, Spain** |
| **Prof. Dr. Soumia KOUADRI MOUSTEFAI** | **Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria** |
| **Prof. Dr. Ümmühan ÖZDEMİR ÖZMEN** | **Gazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Zeliha SELAMOĞLU** | **Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Bensaber BENSEBIA** | **Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria** |
| **Assoc. Prof. Dr. Eva URGEOVA** | **University of Ss. Cyril and Methodius, Slovakia** |
| **Dr. Azhar RASUL** | **Government College University, Pakistan** |
| **Dr. Ramin Ekhteiari SALMAS** | **King's College London, United Kingdom** |
| **Dr. Sachiyo ABURATANI** | **National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan** |

**GENERAL COORDINATOR**

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

**INTERNATIONAL SCIENTIFIC COMMITTEE***

| | |
|---|---|
| **Prof. Dr. Abdullah MART** | **Osmaniye Korkut Ata University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Abdunnasır YILDIZ** | **Dicle University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Adem ÖNAL** | **Gaziosmanpasa University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV** | **Yıldız Technical University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Adnan AYHANCI** | **Eskişehir Osmangazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ahmed IMTIAJ** | **University of Rajshahi, Bangladesh** |
| **Prof. Dr. Ahmet AKSOY** | **Akdeniz University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ahmet ASAN** | **Trakya University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ahmet KARADAG** | **Bartın University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Aida SAHMUROVA** | **Okan University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ali ERDOĞAN** | **Akdeniz University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ali BİLGİLİ** | **Ankara University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Arife Alev KARAGÖZLER** | **Aydın Adnan Menderes University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Atila YILDIZ** | **Ankara University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ayla BALABAN GUNDUZALP** | **Gazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Belma ASLIM** | **Gazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Bülent KAYA** | **Akdeniz University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Dilek DEMİREZEN YILMAZ** | **Erciyes University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ebru Gül ASLAN** | **Süleyman Demirel University, Turkey** |
| **Prof. Dr. E. Sümer ARAS** | **Ankara University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Elif ÖZTETİK** | **Eskisehir Technical University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Elif Şahin IŞGIN** | **Dokuz Eylul University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Emin SARIPINAR** | **Erciyes University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Emine ARSLAN** | **Selçuk University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ** | **Başkent University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Engin TİLKAT** | **Batman University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Erdogan CICEK** | **Nevsehir Hacı Bektaş Veli University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Erdal BALCAN** | **Celal Bayar University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Fatma Jale GÜLEN** | **Yıldız Technical University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Fatma ÜNAL** | **Gazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ferda CANDAN** | **Cumhuriyet University, Turkey** |
| **Prof. Dr. F. Zehra KÜÇÜKBAY** | **İnönü University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ** | **Ankara University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ** | **Hatay Mustafa Kemal University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU** | **Gazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ** | **Middle East Technical University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU** | **Hacettepe University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Gülsen ASMAN** | **Gazi University, Turkey** |

| | |
|---|---|
| **Prof. Dr. Güray UYAR** | **Ankara Hacı Bayram Veli University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Handan UYSAL** | **Atatürk University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Hasan Basri ILA** | **Cukurova University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN** | **Selçuk University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Hasan KÜÇÜKBAY** | **İnönü University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Hayati TÜRKMEN** | **Ege University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Hülya ÖLÇER FOOTITT** | **Dumlupınar University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Hüseyin GÜHER** | **Trakya University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER** | **Osmaniye Korkut Ata University, Turkey** |
| **Prof. Dr. İbrahim ÖRÜN** | **Aksaray University, Turkey** |
| **Prof. Dr. İhsan AKYURT** | **Giresun University, Turkey** |
| **Prof. Dr. İsmail AYDIN** | **İstanbul University-Cerrahpaşa, Turkey** |
| **Prof. Dr. Jitendra PANWAR** | **Birla Institute of Technology & Science (BITS), India** |
| **Prof. Dr. Kadir YURDAKOÇ** | **Dokuz Eylül University,Turkey** |
| **Prof. Dr. Kamil KOÇ** | **Celal Bayar University,Turkey** |
| **Prof. Dr. Kayahan FISKIN** | **Akdeniz University,Turkey** |
| **Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL** | **Zonguldak Bülent Ecevit University,Turkey** |
| **Prof. Dr. Mehmet Rüştü KARAMAN** | **Ankara University,Turkey** |
| **Prof. Dr. Mikail AKBULUT** | **Erciyes University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Miloudi HLAIBI** | **University of Hassan II Casablanca, Morocco** |
| **Prof. Dr. Muhammet GAFFAROĞLU** | **Ahi Evran Üniversitesi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Murat ÇELİK** | **Atatürk University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Mustafa ATEŞ** | **Ege University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN** | **Istanbul Technical University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Mustafa TÜRKMEN** | **Giresun University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Naime Funda TAY** | **Eskişehir Osmangazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN** | **Pamukkale University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Nilgün ÖZPOZAN** | **Erciyes University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Noor Hasima NAGOOR** | **University of Malaya, Malaysia** |
| **Prof. Dr. Numan HODA** | **Akdeniz University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Nursel PEKEL BAYRAMGİL** | **Hacettepe University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Oktay ARSLAN** | **Balıkesir University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Osman DUMAN** | **Akdeniz University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ömer IŞILDAK** | **Gaziosmanpasa University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ömer KOZ** | **Bursa Technical University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ömür BAYSAL** | **Mugla Sıtkı Koçman University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Özlem ÇETİN ERDOĞAN** | **Trakya University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU** | **Akdeniz University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ramazan ERENLER** | **Gaziosmanpasa University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ramazan SOLMAZ** | **Bingöl University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Remziye DEVECİ** | **Ege University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Rıdvan ŞEŞEN** | **Dicle University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Rosa Maria ORRIOLS** | **International Comission Occupational Health, Spain** |
| **Prof. Dr. Sadık DINCER** | **Cukurova University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ** | **Hacettepe University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Salih DOĞAN** | **Erzincan University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ** | **Ege University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Semra İLHAN** | **Eskişehir Osmangazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Sevgi SEVSAY** | **Erzincan Binali Yıldırım University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Sinem GÖKTÜRK** | **Marmara University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Serpil YENİSOY KARAKAŞ** | **Abant Izzet Baysal University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Sevda KIRBAĞ** | **Fırat University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Sevil TOROGLU** | **Kahramanmaras Sutcu Imam University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Sevim AKYÜZ** | **İstanbul Kültür University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Sibel AKAR** | **Eskişehir Osmangazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Soumia KOUADRI MOUSTEFAI** | **Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria** |
| **Prof. Dr. Süheyla KIRMIZIGÜL** | **Ege University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS** | **Cumhuriyet University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU** | **Recep Tayyip Erdoğan University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Şule Coşkun CEVHER** | **Gazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Talat OZPOZAN** | **Erciyes University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Tamer AKAR** | **Eskişehir Osmangazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Tülin ASKUN** | **Balıkesir University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Tülin AYDEMİR** | **Celal Bayar University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Ümmühan Özdemir ÖZMEN** | **Gazi University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Yüksel ABALI** | **Celal Bayar University, Turkey** |
| **Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ** | **Gazi University, Turkey** |

| | |
|---|---|
| **Assoc. Prof. Dr. Alime Ebru AYDIN** | **Hatay Mustafa Kemal University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Altuğ Mert SEVİM** | **Istanbul Technical University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM** | **Cukurova University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Aysel GÜVEN** | **Başkent University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU** | **Mehmet Akif Ersoy University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Ayşe Dilek ÖZŞAHİN KİREÇCİ** | **Bitlis Eren University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Başak HANEDAN** | **Atatürk University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Belgin GÖZMEN SÖNMEZ** | **Mersin University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Berrin DURAN** | **Eskisehir Osmangazi University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Bensaber BENSEBIA** | **Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria** |
| **Assoc. Prof. Dr. Ebru GÜREL-GÜREVİN** | **İstanbul University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Elif Damla ARISAN** | **İstanbul Kültür University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Erol AKPINAR** | **Abant Izzet Baysal University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Eva URGEOVA** | **University of Ss. Cyril and Methodius, Slovakia** |
| **Assoc. Prof. Dr. Gizem Dinler DOGANAY** | **Istanbul Technical University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Hasan ÇABUK** | **Bülent Ecevit University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN** | **Cukurova University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Ilgaz AKATA** | **Ankara University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK** | **Hacettepe University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN** | **Hacettepe University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. M. Burcu Irmak YAZICIOĞLU** | **Halic University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Mehmet GÖNEN** | **Süleyman Demirel University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Mehtap TEKŞEN** | **Aksaray University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Mustafa BOGA** | **Nigde Omer Halisdemir University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Nazlı SARIKAHYA** | **Ege University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Ouahida BENSEBIA** | **USTHB University, Algeria** |
| **Assoc. Prof. Dr. Önder YUMRUTAŞ** | **Adıyaman University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Özcan YALÇINKAYA** | **Gazi University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Özgur ARAR** | **Ege University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Özlem ÖZBEK** | **Hitit University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Róbert GYEPES** | **Charles University, Czech Republic** |
| **Assoc. Prof. Dr. Serap Yalçın AZARKAN** | **Ahi Evran University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Şule BARAN** | **Sakarya University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Şükran YILDIZ** | **Celal Bayar University, Turkey** |
| **Assoc. Prof. Dr. Tugay AYAŞAN** | **Osmaniye Korkut Ata University, Turkey** |
| **Assist. Prof. Dr. Adnan ALDEMİR** | **Van Yüzüncü Yıl University, Turkey** |
| **Assist. Prof. Dr. Banu Şebnem ÖNDER** | **Hacettepe University, Turkey** |
| **Assist. Prof. Dr. Cumali ÇELİK** | **Yalova University, Turkey** |
| **Assist. Prof. Dr. Engin BAT** | **Middle East Technical University, Turkey** |
| **Assist. Prof. Dr. Mostafa NORİZADEH** | **Bülent Ecevit University, Turkey** |
| **Dr. Chong Yee LING** | **Universiti Malaysia Sarawak, Malaysia** |
| **Dr. Jana SOBOTNÍKOVÁ** | **Karlova University, Czech Republic** |
| **Dr. Meghane TARE** | **Birla Institute of Technology & Science (BITS), India** |
| **Dr. Nur Airina MUHAMMAD** | **University of Malaya, Malaysia** |
| **Dr. Ryan BAIDYA** | **California Takshila University, USA** |
| **Dr. Sachiyo ABURATANI** | **National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan** |

*This list is arranged in alphabetical order.

**CONFERENCE SECRETARIATS**

| | |
|---|---|
| **Assist. Prof. Dr. Demet DOĞAN** | **Gaziantep University, Turkey** |
| **Assist. Prof. Dr. Mustafa SEVİNDİK** | **Osmaniye Korkut Ata University, Turkey** |
| **Eylem KINA** | **Gaziantep University, Turkey** |

# FOREWORD

*3rd International Eurasian Biological and Chemical Sciences Conference* (*EurasianBioChem 2020*) was successfully held on March 19-20, 2020 with a great participation.

The objective of *EurasianBioChem 2020* was to bring leading academicians, researchers, scholars as well as industrial professionals together from all over the world to exchange and share their experiences and research results about all aspects of biological and chemical sciences and to discuss the practical challenges encountered and the solutions adopted. In this context, we welcomed precious scientists and the greatest appreciation goes to all participants whose contributions have made this conference a success.

I would like to thank the organizing committee, the scientific board and conference secretariat providing this intense and quality scientific environment embracing biological and chemical sciences.

I believe that the *EurasianBioChem 2020* has made important contributions to you at large and hope to see you at the *4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences.*

**Prof. Dr. Muhittin DOĞAN**

**Chairman of EurasianBioChem'20**

# CONTENTS

**1. FULL-TEXT PAPERS ..... xii**

**1.1. ORAL PRESENTATIONS ..... xii**

An enzyme-free glucose biosensor based on CuO nanostructures anchored on flexible printed circuit board ..... 1

Investigation of the neuroprotective effects of *Sideritis brevibracteata* extract against rotenone-induced neurodegeneration ..... 9

Antioxidant activity of ascorbic acid on sodium fluoride induced cytotoxicity, oxidative damage, and apoptosis in Leydig cells ..... 15

*Ecoli* Nissle 1917- history, probiotic affect and medical use ..... 23

Retrospective evaluation of routine biochemical blood parameters in children with cerebral palsi ..... 29

Retrospective evaluation of routine hematology blood parameters in children with autism ..... 34

Vitamin C prevents arsenic-induced oxidative and DNA damage in TM3 cell line ..... 40

Removal of olive mill wastewater (OMW) using H3PO4 treated olive stones (AOLS) as an efficient adsorbent and electrocoagulation process ..... 48

SonoFenton ve Ultrases/$H_2O_2$ Prosesleri ile Kağıt Endüstrisi Atıksuyundan KOİ Giderimi ..... 53

Fe(III) İyonu İçeren $MnO_2$ Katalizörü ile Endüstriyel Atıksu Arıtımı: Heterojen Fenton ..... 58

A Novel and Efficient Disinfection Modelling with BiOCl/Bent catalyst against variety Microorganisms under Visible Light ..... 63

Listeriosis outbreaks ..... 71

Çeşitli Jojoba Yaprak Ekstrelerinin Güneşten Koruma Potansiyelinin Belirlenmesi ..... 77

Kamkat (*Fortunella margarita*) Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin Antibakteriyel Aktivitesi ..... 84

*Pistacia terebinthus* Meyve Ekstrelerinin *Bacillus cereus* ve *Micrococcus luteus* Üzerinde Antibakteriyel Aktivitesi ve Probiyotik Adayı Laktik Asit Bakterileri ile Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi ..... 90

Farklı fungusitlerin (kresoxim-methyl, propamocarb ve hymexazol) genotoksik potansiyellerinin *Drosophila* komet yöntemleri ile araştırılması ..... 96

The Effects of Acrylamide and Vitamin E on Pregnancy Model Rats ..... 103

Zeytin Yaprağı Metanol Ekstresinin *Escherichia coli* O157:H7 ve *Candida albicans* ATCC 10231'e karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi ..... 107

Characterization and migration from an Epoxy coating to foodstuffs ..... 114

Ankara Bölgesi'nde 2015 ve 2016 Yıllarında Çeşitli Gıdalardan Izole Ve Identifiye Edilen Gıda Patojenlerinin Ve Indikatör Bakterilerin Durumu ..... 120

Identifying the Role of Speedy/RINGO on Mitogenic (MAPK) and Survival (AKT) Pathyways Interaction in Neuroblastoma Cells ..... 126

Isolation and characterization of thermophilic bacteria from hot spring in Çermik, Diyarbakır ..... 132

Hidroponik (Su Kültürü) seralarda rüzgar-güneş hibrit sistemlerle iklimlendirmenin sağlanabilirliği: Tekirdağ ili örneği ..... 140

Diyarbakır Eğil'de petrolle kirletilmiş topraktan petrol parçalayan bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması ..... 147

Probiotic effects of *Bifidobacterium* species ..... 155

İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri ve Virolojideki Kullanım Alanları ..... 163

Zeytinyağı Endüstrisi Atıksularının Kitosan Koagülasyonu ile Ön Arıtımı ..... 174

Antimicrobial Activity of Different Extracts of *Tragopogon porrifolius* and ... 182
Anchusa leptophylla ... 182
Köpeklerde Sol Ventrikül Segmenter Duvar Hareket Bozukluğunun Ekokardiyografi İle Değerlendirilmesi ... 189
Investigation of mobile phone usage behaviors of students according to education status ... 195
Dondurma üretiminde kullanılan maddeler ve fonksiyonel bir gıda olarak meyveli dondurma ... 202
Süt ve süt ürünlerinde aflatoksinlerin önemi ve Türkiye'deki durum ... 208
Mikroorganizmalardan biyohidrojen eldesi yöntemlerinin karşılaştırılması ve uygulanabilirliği ... 214
Biyodizel üretiminde kullanılan çeşitli kaynakların enerji verimliliğinin ve sürdürülebilirliğinin değerlendirilmesi ... 219
Karasu Kent Merkezinin Çevresel Gürültü Düzeyinin Saptanması ... 224
The role of the capping agents on the inorganic nano-pigment synthesis ... 232
Ocratoxin A and its problems in food ... 238
Improvement of the properties of recycled PA-6 by reactive extrusion with chain extenders ... 246
Küçük RNA'ların bakterilerde biyofilm oluşum sürecine etkileri ... 254
Detection of breakpoint in pome fruit growth using piecewise linear regression ... 264
Synthesis and characterization of novel 5-substituted isatins-thiosemicarbazone including methyl benzoate ... 267
Synthesis and spectroscopic studies of novel Schiff bases from carbohydrazide ... 274
Endokrin Bozucu Kimyasalların Obezojenik Etkileri ... 280
Yapay aydınlatmanın pankreas gelişimi üzerine etkileri ... 285
Nörotoksin maruziyeti durumunda 3-piridin boronik asidin etkileri ... 289
Gestasyonel diyabet modeli olarak zebra balığı embriyoları ... 297
Diagnostik röntgen maruziyetinin zebra balığı embriyosu üzerine etkileri ... 304
Rotenon Toksisitesi Durumunda Kaprilik Asidin Etkileri ... 308
Investigation of antibacterial activities of fruit extracts against *Enterococcus faecalis* ... 315
Neurochemicals That Affect SHSY-5Y Cell Differentiation and Cell Response ... 319
Coronene surface as alpha radiation binder ... 325
Değişik oranlarda poliakrilonitril ve karbon elyaf takviyeli geri dönüşümlü polipropilen polimer kompozitlerinin mekanik değerlerdeki değişimlerin incelenmesi ... 330
Poliakrilonitril ve karbon elyaf takviyeli geri dönüşümlü polipropilen polimer kompozitlerinin fiziksel özelliklerinin incelenmesi ... 338
Functionalization of carbon nanotubes for the drug delivery in cancer treatment ... 347
Cultivation, isolation and identification of *Acidithiobacillus ferooxidans* from Artvin mine drainage and evaluation of its biodegradation on polycyclic aromatic hydrocarbons ... 356
Preperation of a Nanostrucered Biocomposite and Analysis of Sensitivity to Heavy Metal ... 363
Cobalt-Embedded Poly(3-Methyl Thiophene) Film as Electrocatalyst Toward Hydrogen Evolution Reaction ... 368
Mikroplastiklerin doğadaki varlığı ve olası riskleri ... 375
Oda sıcaklığında çalışan katkılı ZnO ince filmlerin yapısal, morfolojik ve hidrojen ... 383

gaz algılama analizleri ..... 383

Genetic stability determination of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck one-year old *in vitro* culture clones via ISSR markers ..... 390

Exploring mutable *TREX1* gene in systemic lupus erythematosus patients ..... 394

Chemical composition of endemic *Origanum saccatum* plants grown naturally in Ermenek flora at different locations ..... 403

Determination of volatile organic compounds by GC-MS and antioxidant capacity in methanol and ethanol extract of kale seed ..... 417

The investigation of the effect of different hemofiltration models on trace elements in acute renal failure patients ..... 425

*Phaseolus vulgaris*'te metal tolerans proteininin (MTP) genom bazında analizi ..... 434

*Phaseolus vulgaris*'te süperoksit dismutaz (SOD) genlerinin genom bazında analizi ..... 443

Antibacterial and anticarcinogenic evaluation of Commercial *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* ..... 452

Farklı Kanser Hücre Hatlarında FTO Ekspresyon Seviyelerinin Western Blotlama Yöntemiyle Belirlenmesi ..... 457

A selective turn-off fluorescent sensor for copper (II) ..... 467

Nutrients and Gene Interactions ..... 472

The External Morphology and Histology of Malleolar Sensory System of Gylippus (Paragylippus) monoceros Werner (Solifugae, Arachnida) ..... 481

3D yazdırma parametrelerinin ABS polimerinin mekanik özelliklerine etkileri ve enjeksiyon baskıları ile kıyaslanması ..... 488

Enjeksiyon makinesi ve üç boyutlu yazıcı ile üretilen ABS polimerinin fiziksel özelliklerini karşılaştırılması ..... 495

Antihistaminiklerin kardiyotoksik etkileri ..... 501

İnvers ve Nötr Agonist: Antihistaminikler ..... 510

Toxicity of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles Against *Daphnia magna* ..... 517

"Tombul" fındığının (*Corylus avellana*) çiçek fenolojisi ..... 523

Psychobiotics ..... 529

Ham bal ve piyasadan temin edilen bal numunelerinin invertaz enzimi açısından karşılaştırılması ..... 536

Akıllı tarım uygulamalarının konvansiyonel tarım uygulamalarına göre çevre kirliliği açısından üstünlükleri ..... 542

Evaluation of the effect of coffee and carbonated beverages on calcium phosphate precipitation, in the point of formation of calculus ..... 548

Comperative Study of Tungsten Sulfide Based Catalysts for Photocatalytic Hydrogen Evolution ..... 555

Kuşburnu ekstraktı kullanılarak grafenin yeşil sentezi ..... 558

Fenton Ve Foto-Fenton Yöntemleri İle, Direct Blue 71 Boyasının ,KOİ Ve Renk Gideriminin İncelenmesi ..... 564

Direct Yellow 86 Tekstil Boyar Maddesinin Sulu Çözeltilerinden Renk ve KOİ Gideriminde İleri Oksidasyon Proseslerinin Verimliliğinin İncelenmesi ..... 577

Kanatlı hayvanlarda enkapsülasyon yönteminin organik asit ve esansiyel yağlar ile birlikte kullanılmasının etkileri ..... 591

The effects of cadmium applications on soluble compound contents of tomato (*Lycopersicon esculentum* mill. cv astona) ..... 597

Investigation of phase change properties of encapsulated oleic acid-hexadecane eutectic mixture ..... 602

Natural Material and Natural Material Additive Alginate Based Microcurrent Synthesis and Malahite Green Removal from Wastewaters ..... 608

Embryo culture and applications in biotechnology ..... 615

Nonspecific and Substrate Affinity Immobilization of Pectinases from Model Mixture on Magnetic Support ..... 620

Application of Low-Pressure to Bake Gluten-Free Cake ..... 627

*Stigmaeus mitrofanovi* Khaustov Türünün (Trombidiformes: Stigmaeidae) Türkiye'den İlk Kaydı ..... 632

The protective effect of erythropoietin on apoptotic cell death induced by amyloid β in PC12 cells. ..... 638

NMR Relaxometry as a Tool to Understand the Effect of HHP on the Gelation Properties of Fish Gelatin ..... 646

Ham balın süt proteinleri üzerine etkisinin elektroforetik olarak incelenmesi ..... 652

Total organic carbon and chemical oxygen demand ratio of surface waters in Konya basin ..... 658

Üniversite öğrencilerinin öğün tüketim durumları ve tercihlerinin değerlendirilmesi ..... 667

Evaluation of meal consumption status and preferences in university students ..... 667

Kıyı bölgelerinde atık kirliliğine maruz kalan midyelerde metallerin biyoakümülasyonu ve insan sağlığı üzerindeki etkileri ..... 672

5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion' un sentezi ve gizli parmak izlerinin tespitinde kullanımı ..... 678

Contribution of dissolved sodium and dissolved chloride ions to total electrical conductivity of three selected water bodies ..... 685

Secondary metabolites of marine-derived *Aspergillus costaricaensis* ..... 688

Polikistik over sendromunda CYP450 regülasyonu ..... 693

Milk added to beverages affect the color stability of composite resins? ..... 698

Ülkemizde piyasada bulunan organik besinler ve bunlara ilişkin bazı özelliklerin değerlendirilmesi 705

Effect of different mouthwashes on the surface properties of composite resins used for aesthetic purposes ..... 709

Zebra balığı embriyosunda yapay aydınlatmanın melatonin ekspresyonuna etkileri ..... 715

Anatomical structure and ecological of *Orchis simia* Lam. and its on contribution to the taxonomy of Orchidaceae ..... 719

Transglutaminaz enzimi kullanılarak üretilen pastırma çeşitlerinin uçucu bileşikleri ..... 726

Studies to increase the shelf life of traditional meat products exposed for sale in our country ..... 730

The variation in the size fractionation of chlorophyll a with phytoplankton biomass along the Dardanelles Strait. ..... 737

Food-based protein nanofibers produced by electrospinning ..... 742

*Cheletomimus* (*Hemicheyletia*) *bregetovae* (Volgin) (Acari: Cheyletidae) Türünün Dişi Bireylerinin Merkezi Kıllarında Görülen Sayısal Varyasyonlar ..... 747

Investigation of changes in growth and amount of water soluble vitamins in *Citrobacter freundii* under cadmium stress ..... 755

Boron levels in bottled waters in Turkey ..... 763

Juglon yüklü kitosan doku iskelesi üretimi ve karakterizasyonu ..... 768

Determination of selenium in tap water by voltammetry ..... 776

Berrak hücreli renal hücre karsinomu hastalarının idrar örneklerinde MDA ve AOPP parametrelerinin incelenmesi ..... 784

Kabak çekirdeği yağı yüklü PEG-PCL misellerinin meme kanseri ve glioma hücreleri üzerine etkisinin incelenmesi ..... 789

Phytotherapy ..... 797

Adaptation of plants to environmental stress conditions ..... 801

Sekonder metabolitler ..... 809

Impact of particle size on physical and tablet properties of eggshell powders ..... 816

The antioxidant status of fruit extracts of *Prunus laurocerasus* under oxidative damage $H_2O_2$-induced on human lymphocyte culture ..... 824

Treatment of tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) from wastewater with advanced treatment methods ..... 828

Preparation of chloride selective membrane electrode ..... 836

B12 vitaminin diferansiyel puls polarografisi ile tayini ..... 843

Coronene surface as alpha radiation binder ..... 850

Chemical composition of essential oils of *Hypericum perforatum* L. growing wild in Turkey ..... 855

Demir oksit ($Fe_2O_3$) nanopartiküllerinin genotoksisitesinin KOMET yöntemi ile araştırılması ..... 860

Meyve asitleriyle zenginleştirilmiş çavdar unu bazlı yenilebilir film üretim ve karakterizasyonu ..... 868

Türkiye'deki bir devlet üniversitesi yerleşkesindeki kişilerin tavuk eti üretimi ve tüketimine bakış açıları ..... 875

**1.2. POSTER PRESENTATIONS ..... 880**

The relationship between cocaine and amphetamine-regulated transcript (cart) gene polymorphism ın childhood obesity ..... 881

The effect of *Punica granatum*, *Camellia sinensis*, *Aloe vera* on the expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes in prostate cancer ..... 887

Investigation of Antimicrobial, Antibiofilm and Cytotoxic Activities of Some Disinfectant Agents ..... 896

Melaminin DNA ile etkileşiminin incelenmesi ..... 901

Tahıllı ve Tahılsız Ticari Kuru Köpek Mamaların In vitro Organik Madde Sindirimi ve Bazı Fermentasyon Özelliklerinin Karşılaştırılması ..... 906

Association between single nucleotide polymorphisms of vitamin d receptor gene and diabetes with progression of benign prostatic hyperplasia ..... 912

Antibacterial activity of *Cornus mas* L. fruit extracts ..... 919

Isolation and Identification of Probiotics from Whey ..... 923

Boyar Maddelerin Güneş Işığı ile Fotokimyasal Oksidasyonunun İncelenmesi ..... 927

Determination of antibacterial activity of *Rosa canina* L. fruit extracts ..... 930

Determination of antibacterial activity of *Prunus laurocerasus* L. fruit extracts ..... 934

Investigation on Hydrocarbon Degradation Ability Of Some Halophilic Microorganism Isolates ..... 938

Toryum elementi ve kimyasal özellikleri ..... 941

Çevremizde kullanılan nano teknolojik ürünler ..... 946

Oksidatif stres biyobelirteçleri ve kotinin düzeylerinin sigara maruziyeti ile ilişkisinin incelenmesi . 954

Potential of Turkish *Salix* L. species: Bioactivity and phytochemistry-a review..... 959

# 1. FULL-TEXT PAPERS

# 1.1. ORAL PRESENTATIONS

# An enzyme-free glucose biosensor based on CuO nanostructures anchored on flexible printed circuit board

Mehmet Tetik[1], Özlem Kap[2], Gorachand Dutta[3,4], Volkan Kılıç[5], Despina Moschou[3] and Nesrin Horzum[1,2]*

[1]Izmir Katip Celebi University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biocomposite Engineering, Izmir, Turkey
[2]Izmir Katip Celebi University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Engineering Sciences, Izmir, Turkey
[3]University of Bath, Centre for Biosensors, Bioelectronics and Biodevices (C3Bio) and Department of Electronic & Electrical Engineering, Bath BA2 7AY, United Kingdom
[4]Indian Institute of Technology Kharagpur, School of Medical Science and Technology (SMST), Kharagpur, West Bengal 721302, India
[5]Izmir Katip Celebi University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Electrical and Electronics Engineering, Izmir, Turkey

*Corresponding author e-mail: nesrin.horzum.polat@ikcu.edu.tr

## Abstract

Diabetes is foreseen as an emerging pandemic, particularly for low- and middle-income countries; an increasing number of patients during the following years is anticipated, owing to the increasing trend in childhood obesity and hence prediabetes condition. Therefore, for the early diagnosis of diabetes, we aimed to develop a point of care glucose testing using non-enzymatic glucose biosensors which reduce sensor instability and repeatability issues attributed to immobilized glucose oxidase activity degradation over time and storage conditions. Here, we report the flexible printed circuit (FPC) board integrating passive microfluidics and non-enzymatic glucose electrochemical biosensor using CuO nanostructures drop-casted on an FPC electrode surface.

The sensing electrodes were designed in FPC CAD software (Altium®) and commercially fabricated. The working, counter, and reference electrodes, which were commercially copper electroplated with a hard-gold finish, were connected to a potentiostat (Ivium pocketstat, The Netherlands) to obtain the chronoamperometric signals. The gold-plated electrodes were cleaned prior to drop casting of CuO nanostructures including nanoparticles and nanofibers by two step-ultrasonication process with acetone/ethanol/water followed by ammonium hydroxide/hydrogen peroxide/water solution. CuO nanostructures, which were conducted by thermally treated both metal precursors and electrospun composite fibers, were dispersed in ethanol solvent and drop casted for five times on the working electrodes. 100 mM glucose was prepared in 0.1 M NaOH solution and stored it overnight at ambient conditions for mutarotation. 60 µL glucose sample that prepared in NaOH was dispensed onto the sensor. This assay exhibits a highly linear response from 0 µM to 9 mM for CuO nanostructures. The detection limits were found as 10 µM and 50 µM for thermally treated copper precursors with different particle size. In the case of electrospun CuO nanofibers, a lower limit of detection of 15 µM was obtained with a higher glucose selectivity against the NaOH, ascorbic acid and fructose.

**Keywords:** electrochemical, non-enzymatic, glucose detection, copper oxide nanostructures, flexible printed circuit board

## INTRODUCTION

Diabetes is a chronic metabolic disease that is evaluated by high blood sugar levels (or blood sugar) which causes serious damage to the heart, blood vessels, eyes, kidneys, and nerves over time. The most common Type 2 diabetes usually occurs in adults when the body becomes insulin resistant or not getting enough insulin. In the past three decades, the prevalence of Type 2 diabetes has increased dramatically in all income-level countries and particularly 50% increment in children. A chronic condition in which the pancreas produces little or no insulin by itself is called Type 1 diabetes (WHO, 2016). Type 1 diabetes increases by 3% every year, while this rate reaches 5% for preschool children. Around 70 000 Type 1 diabetes are under the age of 20 and

200 children are added to this number almost daily. Therefore, glucose monitoring is an important step for this disease that also affects a large proportion of the child population in Turkey.

A number of studies related to the positive effect of strict diabetes control on the patients' life activities have been reported (Tamborlane et al., 2008; Brauker, 2009). Therefore, medical devices are widely used for diabetes management. It is usually viewed with blood taken from the fingertip. As an alternative to blood glucose measurement by routine finger-pricking, non-invasive continuous monitoring from other biological fluids such as interstitial fluid, saliva, sweat, tear or urine has been explored (Gonzales et al., 2019). However, most commercial glucose monitors use an enzyme-based electrochemical method. Glucose oxidase (GOx) and glucose dehydrogenase (GDH) are the most commonly used enzymes in this technology (Ferri et al., 2011; Vashist et al., 2011). Although GOx is highly selective against glucose molecules and more stable than other enzymes, it quickly loses its activity below pH 2 or above pH 8 and can be irreversibly damaged at temperatures above 40 °C. Exposure to unstable moisture can seriously affect GOx-based sensors (Wilson and Turner, 1992). The most common and serious concern is the stability of enzyme sensors, which results from the internal properties of enzymes. Thermal or chemical deformations during production, storage and use of enzyme-based glucose sensors form the basis of these concerns. Recently, non-biological electrode materials are of considerable attention as an alternative to biosensors.

There are various nanostructures fed by rapid advances in nanotechnology are constantly offering new opportunities for non-enzymatic detection. In particular, metal oxide nanoparticles are frequently used in electroanalytical systems due to their interaction with biological molecules, high selectivity, and low-cost advantages. Furthermore, different metal oxide nanostructure synthesis methods allow us to control not only surface area, size, and stability but also electrical, magnetic and photochemical properties (Zhu et al., 2016). Transition metal oxides such as CuO (Sun et al., 2013; Gou et al., 2018), NiO (Liu et al., 2013), $CeO_2$ (Qian et al., 2020), $SnO_2$ (Zhou et al. 2017), $MnO_2$ (Ponnusamy et al., 2018), $TiO_2$ (Grochowska et al., 2019), and $Fe_2O_3$ (Cao and Wang, 2011) are used due to their functional biocompatibility, non-toxicity, and their excellent catalytic activities. Among them, CuO is preferred to use as non-enzymatic glucose sensors because of its abundancy in nature and low production cost. A number of CuO nanostructures such as nanoparticles (Liu et al., 2012), nanowires (Zhuang et al., 2008; Zhang et al., 2014), nanorods (Cheng et al., 2019; Kim et al., 2019), and nanoflowers (Amani-Beni and Nezamzadeh-Ejhieh, 2017) have been designed and synthesized to increase their internal porosity and electrochemical performance in glucose sensors.

Herein, we have fabricated different sized-CuO nanostructures anchored on flexible printed circuit board and analyzed the effect of nanoparticle size on non-enzymatic glucose detection. The use of CuO nanostructures allows us to tune the electrochemical properties such as the limit of detection and specificity, which can be influenced by experimental parameters like initial precursor homogeneity or calcination temperature, time, and rate.

## MATERIALS AND METHODS

### Synthesis of CuO nanoparticles

The synthesis of the CuO nanoparticles was formed by direct thermal decomposition of copper(II) nitrate hemi(pentahydrate) $Cu(NO_3)_2 \cdot 2½H_2O$ (Riel-de Haen). Optimization of the nanoparticles obtained was achieved by changing the initial particle size and calcination parameters such as temperature, rate, and time. The particle size of the copper precursor was reduced by a disc milling at 1000 rpm for 10 s. Both precursors were weighed as 5 g for each alumina crucibles and heated to 300, 400, 500, 700, and 900 °C in a muffle oven (Protherm furnaces, PLF/20/27, Turkey) for 2h and 5h at the heating rates 1, 4, and 10 °C/min. Based on the homogeneity and morphology of the synthesized particles, the conditions under 400 °C, 5h, 10 °C/min, were chosen for glucose detection.

**Synthesis of CuO nanofibers**

The electrospinning solution was prepared with the ratio 10:20:70 wt% milled $Cu(NO_3)_2 \cdot 2½H_2O$, polyvinyl alcohol (PVA, Mw: 30 000 – 70 000 g/mol, Sigma-Aldrich) and water, respectively. First, distilled water-PVA mixture was prepared by dissolving PVA under vigorous magnetic stirring at 60 °C for 5 h. $Cu(NO_3)_2 \cdot 2½H_2O$ was added into the polymer solution with constant stirring for 4h and the obtained viscous solution was loaded into a plastic syringe. The electrospinning experiments were carried out with a home-made electrospinning setup including a pump model (New Era Pump Systems, Inc. NE-300) and a high voltage power supply (Gamma High Voltage Research, Ormond Beach, FL32174). A positive voltage of 25 kV was applied between the needle and the ground at a distance of 17 cm. The feeding rate was kept at 0.25 mL/h. As-spun PVA/$Cu(NO_3)_2 \cdot 2½H_2O$ nanofibers were collected from the aluminium foil into an alumina crucible placed in the muffle oven and calcined at 400 °C for 5h with a rate of 10 °C/min.

**Morphological and structural characterization of CuO nanostructures**

The morphological characterization of CuO nanostructures was carried out by scanning electron microscopy (SEM) at accelerating voltages of 3-15 kV and working distances of 6-10 mm in a Carl Zeiss 300 VP microscope. The diameter of the particles and fibers were statistically estimated from SEM micrographs by using the software Fiji/ImageJ. X-ray diffraction (XRD) patterns of the nanostructures were recorded in a Philips X'Pert Pro Xray diffractometer using CuKα radiation (λ=1.5418 Å). Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out with an Exstar TG/DTA 7300 thermobalance under oxygen atmosphere and heating rate of 10 °C/min. Surface compositions were determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (Thermo Scientific Al K-Alpha).

**Electrochemical glucose detection using CuO nanostructures**

The sensing electrodes were designed in FPC CAD software (Altium®) and commercially fabricated in a standard FPC manufacturing facility. The copper electrodes were commercially electroplated with a hard-gold finish, exploited as working, counter and reference electrodes and connected to a potentiostat to obtain the chronoamperometric signals. The gold-plated electrodes were cleaned prior to CuO nanoparticle drop-casting by 15 min ultrasonication in acetone, ethanol, and water, respectively and followed by 30 min ultrasonication in a solution containing 5:1:1 water, ammonium hydroxide (20%) and hydrogen peroxide (30%). Ethanol was used for the dispersion of CuO nanoparticles and 0.5 µL of 2 mg/mL CuO nanoparticles suspension was drop casted on working electrodes and dried at room temperature. The drop-casting process was repeated five times on the same working electrode to ensure sufficient CuO NPs loading. A 100 mM glucose was prepared in 0.1 M NaOH solution and stored it overnight at RT to mutarotate the α-D-glucose ⇌ β-D-glucose. Different concentrations of glucose samples were prepared by serially diluting the 100 mM glucose in 0.1 M NaOH solution. Chronoamperometric measurements performed after 60 µL of glucose sample in 0.1 M NaOH at pH 12 was drop cast on the electrode surface, followed by the application of a 0.25 V bias potential. All electrochemical data were obtained at room temperature (25 °C).

**RESULTS and DISCUSSION**

The common point between the three employed strategies to obtain CuO nanostructures used is the controlled heat treatment at 400 ºC for 5h. Firstly, we used direct thermal decomposition of the copper precursor as received and micron-sized particles were obtained. The disc milling process was applied before thermal treatment to obtain smaller particle sizes in the second approach. The third route is to obtain nanofibers from PVA/copper salt solution using the electrospinning technique followed by thermal treatment.

Figure 1 shows SEM micrographs of obtained CuO nanostructures. The first row shows the samples before calcination, while the second-third rows show the samples after calcination at different magnifications. While the particle size of the copper salt was initially 0.5-1.5 mm in size, it was determined that the size of particles was reduced to 35±8 µm after grinding. Reducing millimeter-sized particles to micrometer-sized allowed us to achieve a more homogeneously distributed spherical particles rather than random structure after calcination. Furthermore, the nanosheets (~400 nm in length and ~130 nm in width) were obtained on the inner structure of the CuO particles with a size of 11±3 µm. With the aim of increasing the surface area and porosity of the

nanoparticles, aqueous solution of PVA and copper nitrate was electrospun. Upon calcination of the smooth texture of non-woven composite nanofibers, with an average size of around 250±80 nm, the PVA was removed, crystalline CuO nanoparticles of 35 nm were nucleated on the surface of the nanofiber. Although the average fiber diameter was reduced by about 75% (60±20 nm), the CuO nanofibers preserved their fibrous morphology.

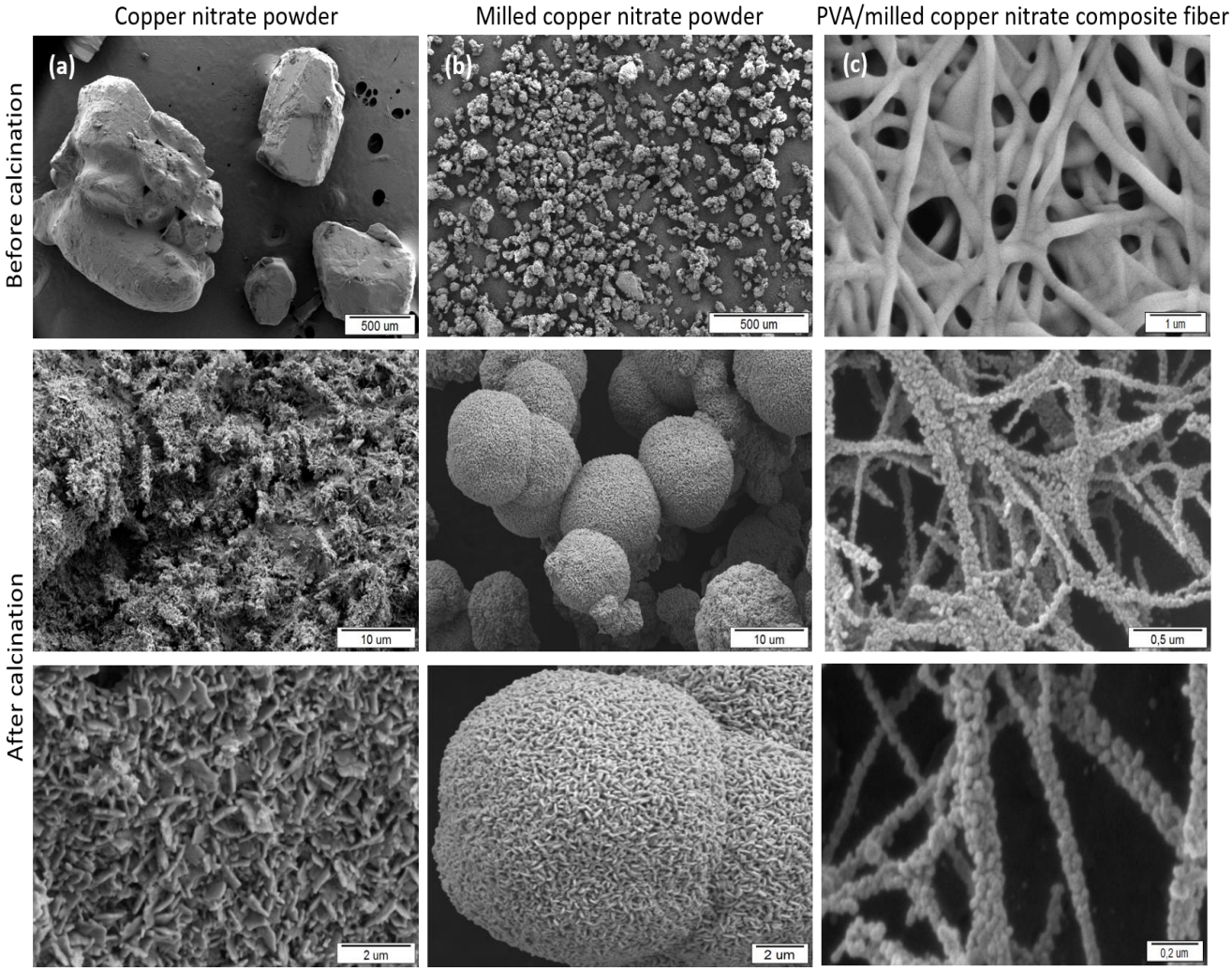



**Figure 1.** SEM micrographs of $Cu(NO_3)_2 \cdot 2½H_2O$ precursors (a) unmilled (b) milled (c) electrospun with the PVA before calcination, CuO nanoparticles and nanofibers after calcination at 400 ºC, 10 ºC/min for 5 hours.

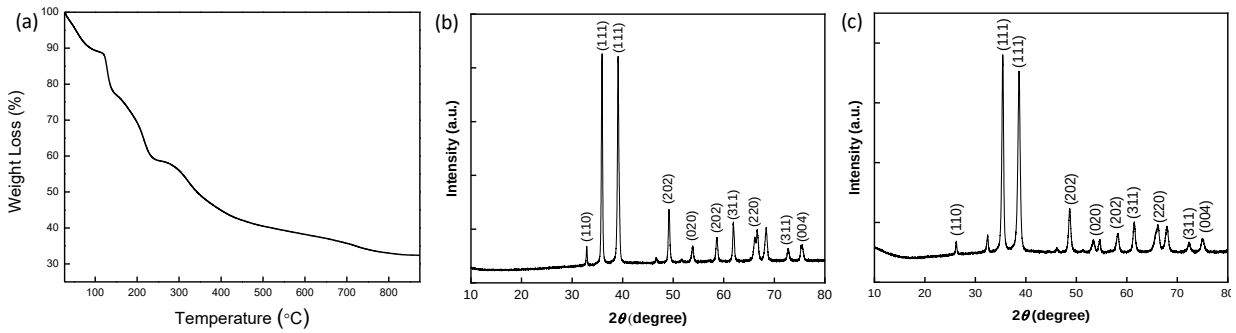



**Figure 2.** (a) TGA thermogram of PVA/$Cu(NO_3)_2 \cdot 2½H_2O$ nanofibers, XRD patterns of CuO (b) nanoparticles (c) nanofibers.

The thermogram of PVA/$Cu(NO_3)_2 \cdot 2½H_2O$ nanofibers and the crystalline structure of CuO nanostructures were shown in Figure 2. The initial weight loss (12%) below 110 ºC was due to the evaporation of moisture around the composite nanofibers. The following 29% weight loss, between 120-260 ºC, may be attributed to the decomposition of $Cu(NO_3)_2 \cdot 2½H_2O$. As the temperature increases, the polymer was removed in the range of 270-830 ºC, leaving behind 32% of CuO. As the ideal temperature for the nanoparticle synthesis is 400 ºC, despite the presence of 10% carbon in the nanofibers, this temperature, as well as the heating rate and time, was chosen to keep the experimental conditions constant. The observed XRD patterns for both CuO nanoparticles and nanofibers correspond to monoclinic CuO phase (JCPDS card no. 01-089-2529) without any diffraction signals attributed to $CuO_2$ or $Cu(OH)_2$. The average crystallite sizes estimated by the Scherrer equation were 20 nm and 17 nm for CuO nanoparticles and CuO nanofibers, respectively. The decrement in the crystallite size can be attributed to the larger surface area and thus a higher number of nucleation sites of the nanofibers compared to the nanoparticles (He et al., 2017).

The chemical composition of CuO nanofibers was analyzed by XPS technique. Figure 3(a) shows the full spectra for the elements present in the electrospun nanofibers. The peak of Na1s may arise from the water which was used as a solvent during polymer solution preparation and Al2p3/2 peak was originated from the foil material that used as the collector during the electrospinning process. As seen on the Figure 3(b), C1s peak centered at 284.0 eV, was observed due to the remaining polymer in the fiber network after the calcination. The binding energy is characteristic for C-C and/or C-H bonds at 284 eV and the peak might be assigned C-O bonds at 289 eV. It is possible to distinguish Cu oxidation states by analyzing the satellite peaks of Cu2p. Figure 3(c) shows the difference between the $Cu2p_{3/2}$ and $Cu2p_{1/2}$ peaks was 20 eV by splitting the spin-orbital components, which indicates the $Cu^{2+}$ oxidation state (Rahman et al., 2018). The satellite peaks are also the evidence of existence of $Cu^{2+}$ on the structure (Krishnamoorthy and Kim, 2013). Figure 3(d) shows the XPS spectra of the major peak of O1s at 529 eV, which indicates the presence of CuO (Jin et. al., 2016).

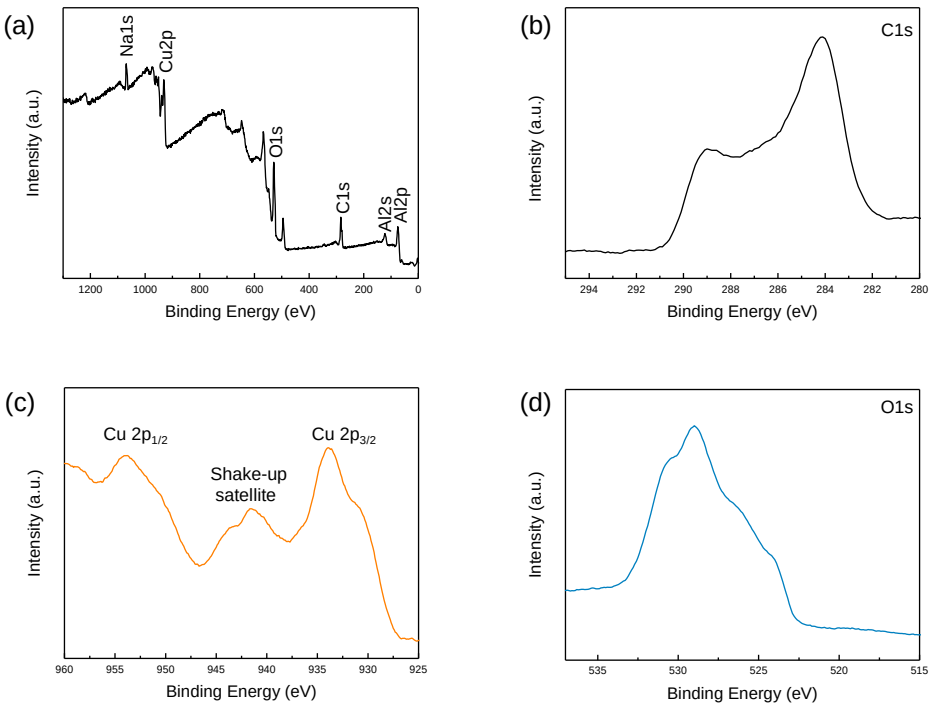



**Figure 3.** (a) XPS survey scan (b) C 1s (c) Cu 2p and (d) O 1s core levels for CuO nanofibers.

Figure 4 shows a front and back view of a flexible printed circuit board (FPC) which was fabricated on a polyimide substrate integrated with passive microfluidics. This system was designed to extract, dilute, and perform a non-enzymatic glucose determination on the same board for a potential wearable device.

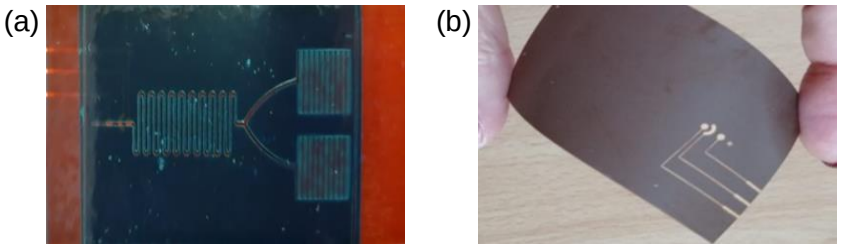



**Figure 4.** A flexible printed circuit (FPC) board microsystem with integrated passive microfluidics; (a) front side and (b) back side.

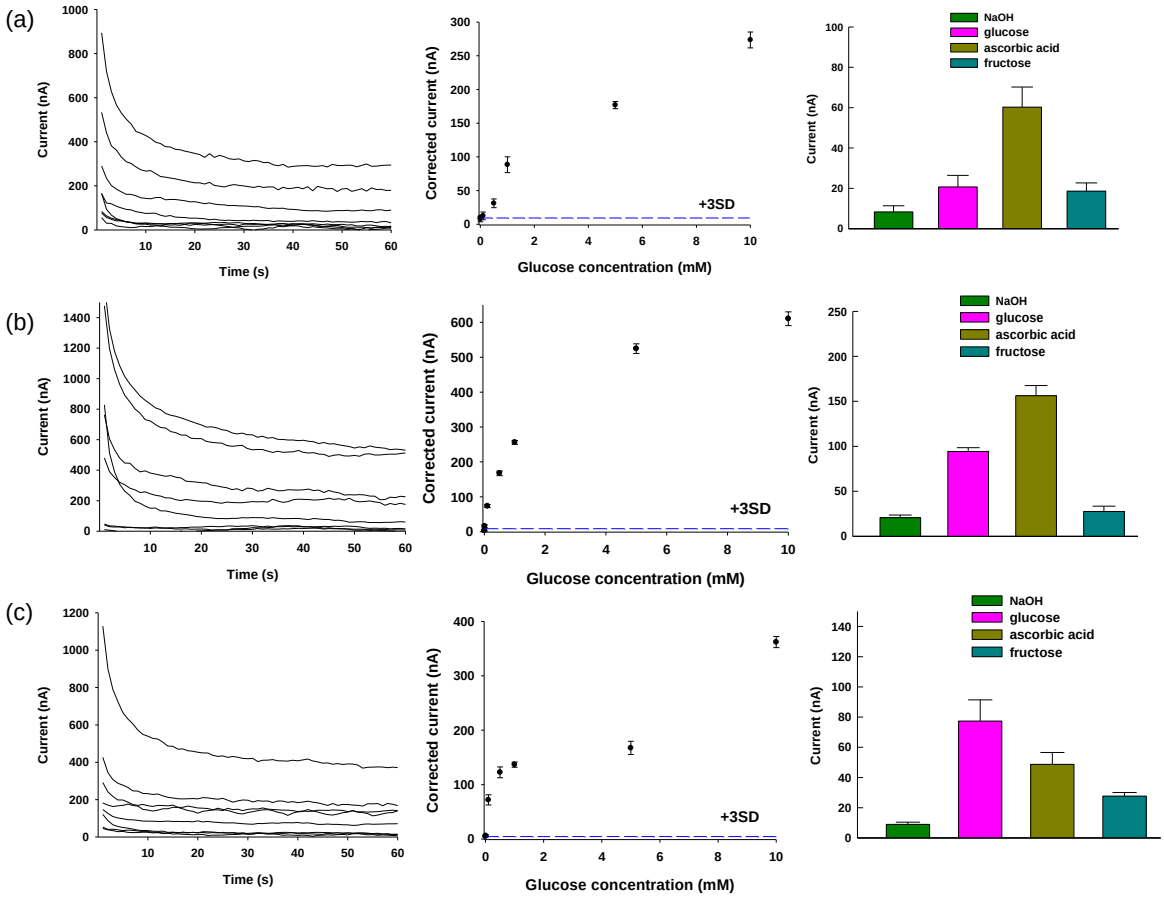



**Figure 5.** Amperometric response against 0-9 mM glucose in NaOH, the calibration graph of the glucose concentration based on chronoamperometric flow at 60 s from the response profile of the CuO-modified electrode system, and chronoamperometric flows of fructose, ascorbic acid, and glucose solutions obtained against NaOH reference solution. (a) Larger-sized CuO particles (b) Smaller-sized CuO particles (c) CuO nanofibers. Each data set represents the mean ± SS of three separate measurements used in the new sensor.

Three different CuO nanostructures were examined for glucose detection performance and specificity tests were shown in Figure 5. The chronoamperometric measurements performed after 60 µL of glucose sample was drop cast on the electrode surface, following an applied 0.25 V bias potential. The chronoamperometric response profiles were changed from 10 µM to 9 mM for each three CuO nanostructures. A calibration plot of the chronoamperometric current was drawn at 60 s and each data point represents three other measurements using electrodes. The detection limit was calculated first by determining 3× the standard deviation (SD) of the signal at zero concentration which is represented by the dashed line. The limit of detection (LOD) was taken

as the lowest detectable concentration upper the +3SD line. Based on the measurements, the glucose biosensor has a LOD of 50, 10, 15 μM for CuO nanostructures in Figure 5(a), (b), and (c), respectively. The lower LOD values were obtained for smaller-sized CuO nanoparticles (11±3 μm) and CuO nanofibers (60±20 nm). The specificity of the interfering species (fructose, ascorbic acid) was performed against the 1 mM glucose-containing NaOH sample. The signals obtained from the glucose was significantly higher for CuO nanofibers compared to the nanoparticles. Although the detection signal for glucose was lower against the ascorbic acid for both nanoparticles, LOD possessed the lower for the smaller-sized CuO nanoparticles. These results suggest that CuO nanofibers will not suffer from interferences with fructose, ascorbic acid and NaOH with a low LOD of 15 μM, which is within the clinical range for glucose for diabetic patients. The high sensitivity and high specificity of the CuO nanostructure-based sensor can be attributed to the surface area, porosity, crystallite size, which allow conduction of electron between the sensing material and the electrodes.

## CONCLUSION

In this paper, the CuO nanostructures have been synthesized by direct thermal decomposition of the copper precursor and electrospinning. The particle size, calcination temperature, heating rate, and time have an effect on the structural stability of the CuO nanostructures. The milling process on the precursor material provides reduction on the size of the CuO nanoparticles. On one hand, smaller-sized CuO nanoparticles modified FPC displayed lower detection limit as 10 μM, while the most interfering compound was ascorbic acid against the glucose among the NaOH and fructose. On the other hand, CuO nanofibers modified FPC displayed better specificity for glucose by 15 μM detection limit. These features make CuO NFs a good candidate in the development of non-enzymatic glucose sensor.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the financial support of the Tubitak and the British Council (Newton Fund Institutional Links, Turkey-UK project: 116E934, 336872)

## REFERENCES

Amani-Beni Z, Nezamzadeh-Ejhieh A 2017. A novel non-enzymatic glucose sensor based on the modification of carbon paste electrode with CuO nanoflower: designing the experiments by response surface methodology (RSM). Journal of Colloid and Interface Science, 504:186-196.

Brauker J, 2009. Continuous glucose sensing: future technology developments, Diabetes Technology & Therapeutics, 11:S-25-S-36.

Cao X, Wang N 2011. A novel non-enzymatic glucose sensor modified with $Fe_2O_3$ nanowire arrays. Analyst, 136:4241–4246.

Cheng S, DelaCruz S, Chen C, Tang Z, Shi T, Carraro C, Maboudian R 2019. Hierarchical $Co_3O_4$/CuO nanorod array supported on carbon cloth for highly sensitive non-enzymatic glucose biosensing. Sensors and Actuators B: Chemical, 298:126860.

Ferri S, Kojima K, Sode K 2011. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. Journal of Diabetes Science and Technology, 5:1068-1076

Gonzales WV, Mobashsher AT, Abbosh A 2019. The Progress of Glucose Monitoring—A Review of Invasive to Minimally and Non-Invasive Techniques, Devices and Sensors. Sensors (Basel), 19:800.

Gou X, Sun S, Yang Q, Li P, Liang S, Zhang X, Yang Z 2018. A very facile strategy for the synthesis of ultrathin CuO nanorods towards non-enzymatic glucose sensing. New Journal of Chemistry, 42:6364–6369.

Grochowska K, Ryl J, Karczewskic J, Śliwińskia G, Cenian A, Siuzdak K 2019. Non-enzymatic flexible glucose sensing platform based on nanostructured $TiO_2$ – Au composite. Journal of Electroanalytical Chemistry, 837:230-239.

He Z, Sun XY, Gu X 2017. $SrTiO_3$ nanoparticles and nanofibers: synthesis and comparison of photocatalytic properties, Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 28:13950–13955.

Jin Z, Liu C, Qi K, Cui X 2017. Photo-reduced Cu/CuO nanoclusters on $TiO_2$ nanotube arrays as highly efficient and reusable catalyst, 7:39695.

Kim K, Kim S, Lee HN, Park YM, Bae YS, Kim HJ 2019. Electrochemically derived CuO nanorod from copper-based metal-organic framework for non-enzymatic detection of glucose. Applied Surface Science, 479:720-726.

Krishnamoorthy K, Kim SJ 2013. Growth, characterization and electrochemical properties of hierarchical CuO nanostructures for supercapacitor applications, 48:3136-3139.

Liu S, Tian J, Wang L, Qin X, Zhang Y, Luo Y, Asiri AM, Al-Youbi AO, Sun X 2012. A simple route for preparation of highly stable CuO nanoparticles for nonenzymatic glucose detection. Catalysis Science & Technology, 2:813-817.

Liu S, Yu B, Zhang T 2013. A novel non-enzymatic glucose sensor based on NiO hollow spheres. Electrochimica Acta 102:104–107.

Ponnusamy R, Gangan AS, Chakraborty B, Late DJ, Rout CS 2018. Non-enzymatic Glucose Sensing Properties of Pd:$MnO_2$ Nanosheets: Synthesis by Facile Microwave Assisted Route & Theoretical Insight from Quantum Simulations. Journal of Physical Chemistry B, 122:7636-7646.

Qian J, Wang Y, Pan J, Chen Z, Wang C, Chen J, Wu Z, Yangyue 2020. Non-enzymatic glucose sensor based on ZnO–$CeO_2$ whiskers. Materials Chemistry and Physics, 239:122051.

Rahman MM, Alam M, Hussain MM, Asiri AM, Zayed MEM 2018. Hydrothermally prepared $Ag_2O$/CuO nanomaterial for an efficient chemical sensor development for environmental remediation, Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 10:1-9.

Sun S, Zhang X, Sun Y, Yang S, Song X, Yang Z 2013. Hierarchical CuO nanoflowers: water-required synthesis and their application in a nonenzymatic glucose biosensor. Physical Chemistry Chemical Physics, 15:10904–10913.

Tamborlane W, Beck R, Bode B, Bukingham B, Chase H, Clemons R, Fiallo-Scharer R, Fox L, Gilliam L, Hirsch I 2008. Continuous glucose monitoring and intensive treatment of type 1 diabetes. New England Journal of Medicine, 359:1464-1476.

Vashist SK, Zheng D, Al-Rubeaan K, Luong JH, Sheu FS 2011. Technology behind commercial devices for blood glucose monitoring in diabetes management: A review. Analytica Chimica Acta, 703:124-136.

WHO, 2016. Global Report on Diabetes, Available at: https://www.who.int/health-topics/diabetes [01.04.2020].

Wilson R, Turner A 1992. Glucose oxidase: an ideal enzyme. Biosensors and Bioelectronics, 7:165-185.

Zhang Y, Liu Y, Su L, Zhang Z, Huo D, Hou C, Lei Y 2014. CuO nanowires based sensitive and selective non-enzymatic glucose detection, Sensors and Actuators B: Chemical, 191:86-93.

Zhou Y, Ni X, Ren Z, Ma J, Xu J, Chen X 2017. A flower-like NiO–$SnO_2$ nanocomposite and its non-enzymatic catalysis of glucose. RSC Advances, 7:45177-45184.

Zhu H, Li L, Zhou W, Shao Z, Chen X 2016. Advances in non-enzymatic glucose sensors based on metal oxides. Journal of Materials Chemistry B, 4:7333-7349.

Zhuang Z, Su X, Yuan H, Sun Q, Xiao D, Choi MM 2008. An improved sensitivity non-enzymatic glucose sensor based on a CuO nanowire modified Cu electrode. Analyst, 133:126-132.

# Investigation of the neuroprotective effects of *Sideritis brevibracteata* extract against rotenone-induced neurodegeneration

Meryem Şahin[1], Ayşegül Köroğlu[2,3], İhsan Çalış[4], Hale Saybaşılı[*1]

[*1]Boğaziçi University, Institute of Biomedical Engineering, Istanbul, Turkey.
[2]Afyonkarahisar Health Sciences University, Faculty of Pharmacy, Afyon, Turkey.
[3]Ankara University, Faculty of Pharmacy, Ankara, Turkey.
[4]Near East University, Faculty of Pharmacy, Lefkoşa (Nicosia), N. Cyprus.

*Corresponding author: saybasil@boun.edu.tr

## Abstract

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in the world and currently, there is no effective treatment. Anti-inflammatory and antioxidant molecules should be considered as candidates for both treatment and prevention of neurodegeneration. Here, we have investigated the neuroprotective effects of *Sideritis brevibracteata* extract, which is an anti-inflammatory and antioxidant plant endemic to Turkey. Differentiated SH-SY5Y cells were used to model PD via rotenone application. In this preliminary study, we have found that 1 µg/mL *S. brevibracteata* protects the cells from rotenone-induced neurotoxicity, however higher doses are toxic to the cells. Purified compounds from the extract will be further investigated to understand the effects of individual compounds within the extract.

**Keywords:** SH-SY5Y; *Sideritis brevibracteata*; antioxidants; neurodegeneration.

## INTRODUCTION

Parkinson's Disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by motor symptoms such as resting tremors, rigidity, gait impairments and bradykinesia and non-motor symptoms such as; cognitive dysfunction, depression and, sleep disorders. Pathologically, loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (SNc) and appearance of insoluble α-synuclein aggregations (Lewy bodies) are observed, leading to the degeneration of nigrostriatal pathway and decrease of dopamine (DA) in the brain.

In PD, the increased expression of cytokines shows microglia involvement in neurodegeneration which implies neuroinflammation. Also, a positive correlation was found between experiencing head trauma during the early years of life and having PD later in life, which is another indicator implying inflammatory involvement in PD (Gilgun-Sherki et al., 2006). SNc has a higher microglia content, hence it is more vulnerable to inflammation (Kim et al., 2000). Besides inflammation, oxidative stress is also implicated in neurodegeneration. High energy demand and high iron concentration of the brain increases oxidative stress because the presence of excess iron induces the conversion of $H_2O_2$ into OH•. As iron is necessary for oxygen transportation and neurotransmitter and myelin synthesis, it is found abundantly throughout the nervous system which makes the brain more susceptible to oxidative stress (Hare et al., 2013). In addition, the activity of electron transport chain Complex I is decreased in PD patients. Due to the lower Complex I activity, $O_2$ takes up only one electron and become partially reduced to O2•, leading to the generation of hydroxyl radical OH•, which is the most dangerous radical for the organism (Raza et al., 2019).

Various studies revealed protective measures, lifestyle and adherence to the Mediterranean diet can prevent neurodegeneration or delay the disease onset (Sezgin and Dincer, 2014; Valls-Pedret et al., 2015; Sohn, 2018). These studies call forth the question of the biological mechanisms on which the Mediterranean diet acts to prevent neurodegeneration. These mechanisms may be related to the high anti-inflammatory and antioxidant content of the foods that are consumed in relatively large amounts in this diet (Livingston et al., 2017). As both inflammation and oxidative stress are thought to be implicated in neurodegenerative diseases, anti-inflammatory and antioxidant molecules can be evaluated as preventive medications for neurodegenerative diseases.

Flavonoids, which are a subgroup of polyphenols, are naturally occurring anti-inflammatory and antioxidant substances that gained popularity since the early 2000s. The availability of these substances through food and drinks explains the interest towards them in the literature (Spagnuolo et al., 2018). Studies show some

flavonoids can pass through blood-brain barrier (Solanki et al., 2015). Besides, flavonoid rich foods were found to enhance cognitive function and prevent neurodegenerative disorders (Macready et al., 2009).

*Sideritis brevibracteata* P.H. Davis or locally "Alanya Adaçayı" is a plant endemic to Turkey, and it is a member of the *Lamiaceace* family. *S. brevibracteata* was proven to have the highest antioxidant effect among the *Sideritis* species (Güvenç et al., 2005). This finding was evaluated more closely when six different flavonoids with hypolaetin, isoscutallerein and 3'-hydroxy-4'-O-methylisoscutellarein glycosides purified from n-butanol extract of *S. brevibracteata* were tested for their anti-inflammatory and antioxidant activities. Güvenç et al. found that these six flavonoids have IC50 values between 0.57 and 3.48 µg/mL via lipid peroxidation of liposomes assay. In their study, the n-butanol extract as a whole exhibited the highest anti-inflammatory activity with 26.9% to 43.8% inhibition (Güvenç et al., 2010).

Rotenone is widely used to model PD *in vivo* and *in vitro*. It is extracted from tropical plants and used as insect and fish poison. Since rotenone is highly lipophilic it can reach the brain easily, passing through the blood-brain barrier. Inside the brain, it will accumulate and act as a Complex I blocker. This accumulation results in oxidative stress and leads to neuronal death (Akkentli et al., 2012). *In vivo* rotenone models of PD showed bradykinesia and postural abnormalities, and also neuronal death in SNc and appearance of Lewy bodies. The selective death of SNc neurons in the presence of rotenone shows the high sensitivity of these neurons to Complex I inhibition (Raza et al., 2019).

In this study, we have evaluated the neuroprotective effects of *S. brevibracteata* n-butanol extract against rotenone-induced Parkinson's Disease model on differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells.

## MATERIALS AND METHODS

SH-SY5Y cell line was kindly provided by Dr. Bora Garipcan (Institute of Biomedical Engineering, Boğaziçi University). Cells were cultured according to the literature with some changes in the concentrations of RA and BDNF (Encinas et al., 2002). Briefly, cells were grown using Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Ham's F12 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (Biosera, France). 2 x $10^4$ cells were seeded on a 48-well plate and incubated at 37 °C. 24 hours after seeding, differentiation medium containing 1 µM RA with 1% FBS was added. Five days later, the medium was replaced with serum-free medium containing 10 ng/mL BDNF. After 48 hours, differentiated cells were ready to use for the experiments for 3-4 days.

First, the concentration of rotenone which 50% of the cells were dead (LC50) was approximated. To do so, after 48 hours of BDNF treatment, BDNF containing serum-free media were removed and, 20 and 50 µM rotenone containing media were added to the cells for 12 and 24 hours.

Prof. Dr. Ayşegül Köroğlu (Faculty of Pharmacy, Ankara University) has generously provided us with n-butanol extract of *S. brevibracteata*. Possible toxic effects of *S. brevibracteata* extract was evaluated by adding 1, 5 and 10 µg/mL *S. brevibracteata* to the media. These concentrations were selected according to the previously determined antioxidant IC50 values (Güvenç et al., 2010).

For the evaluation of neuroprotective effects, cells were preincubated with *S. brevibracteata* for 48 hours before the rotenone application, and rotenone was applied to the cells 24 hours prior to the imaging in combination with fresh *S. brevibracteata*. Control group had 0.02% DMSO added.

Acridine orange/Propidium iodide (AO/PI) cell viability test was performed to evaluate the concentration-dependent effects of rotenone and *S. brevibracteata*, and to investigate the protective effects of *S. brevibracteata* against rotenone, with determined concentrations. For the AO/PI staining solution, 1 µL from each dye solution (5 mg/mL AO and 3 mg/mL PI in absolute ethanol) was mixed in per mL of PBS. The medium was removed and 100 µL from the staining solution was added to each well. The plate was shaken gently for 1 minute. After 1 minute, the wells were washed with 100 µL of PBS. 100 µL of PBS was added after washing. Cells fluoresced green because of the AO staining. Dead cells fluoresced red due to PI. After the images were collected, ImageJ (Version 1.8.0, NIH, USA) was used to count the cells. Each group had three wells and four images were collected from every well.

Statistical analysis was performed using SPSS (Version 25, IBM, USA). First, Shapiro-Wilk normality analysis was performed to decide whether to use a parametric or non-parametric test. Since the data were normally distributed one-way ANOVA, followed by Tukey multiple comparisons test was performed and $p < 0.05$ was considered statistically significant. All values are given as means ± standard deviations. Throughout the results, n represents the number of samples.

## RESULTS

To ensure 50% cell death, high rotenone concentrations were preferred. Cells in the collected images were counted using ImageJ. The number of dead cells was subtracted from number of all cells, to have the number of live cells. The results of the rotenone toxicity analysis are given in Figure 1.

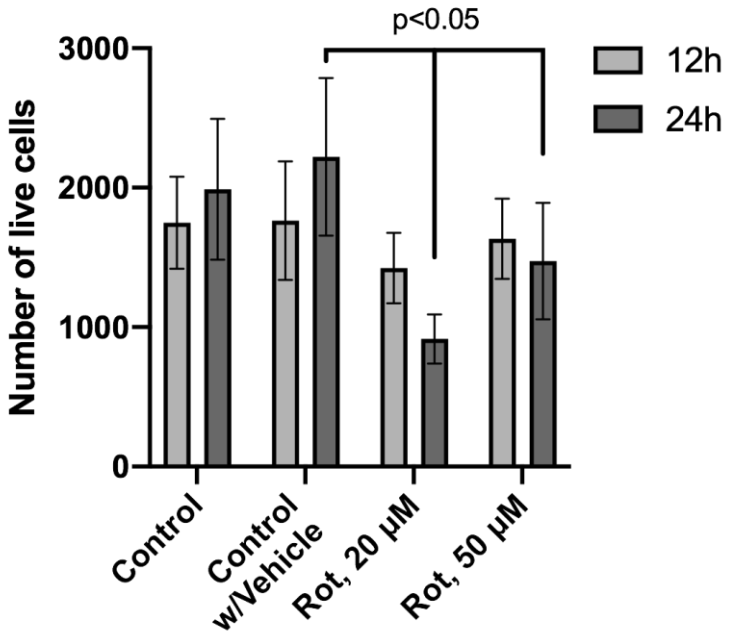



*Figure 1: Rotenone toxicity analysis. Rotenone was applied to the differentiated SH-SY5Y cells for 12 and 24 hours at 20 and 50 µM concentrations. The cell viability decreased by 50% when 20 µM rotenone was applied for 24 hours (n=3).*

This graph showed three important points; (i) Control groups with and without the vehicle (DMSO) can statistically be considered the same, (ii) for observing toxicity, 24-hour incubation is crucial (iii) 20 µM rotenone decreases cell viability by 50% (LD50). Selected rotenone application in our experiments was 20 µM for 24 hours.

The resulting graph for the evaluation of the toxic effects of *S. brevibracteata* is given in Figure 2. It was found that the n-butanol extract of *S. brevibracteata* becomes toxic to cells starting from the 5 µg/mL concentration.

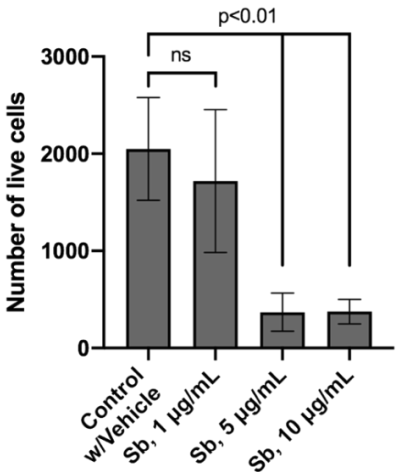



*Figure 2: Sideritis brevibracteata toxicity analysis. S. brevibracteata was applied to the differentiated SH-SY5Y cells for 24 hours at 1, 5 and 10 µg/mL concentrations (n=3). The cell viability started decreasing with 5 µg/mL application.*

Taking previous results into consideration, analyses with *S. brevibracteata* was performed. As control group had no difference with control group containing vehicle, only the latter control was used. Resulting images are given in Figures 3 and 4.

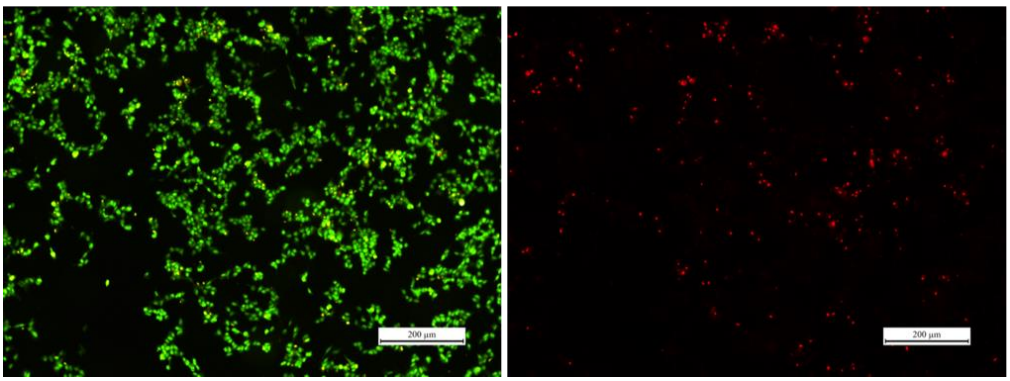


*Figure 3: AO/PI results of 20 µM rotenone application for 24 hours. Green color indicates all cells, red indicates dead cells.*

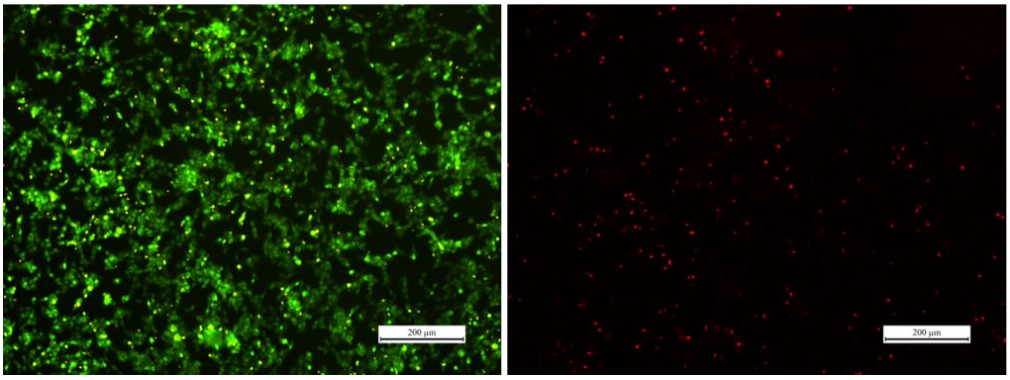


*Figure 4: AO/PI results of 20 µM rotenone and 1 µg/mL S. brevibracteata application for 24 hours. Green color indicates all cells, red indicates dead cells.*

The results of the investigation of the protective effects of *S. brevibracteata* against rotenone induced neurodegeneration is given in Figure 5. According to the graph, 1 µg/mL *S. brevibracteata* group is not different than the control group. And, it is statistically significantly different from the rotenone group.

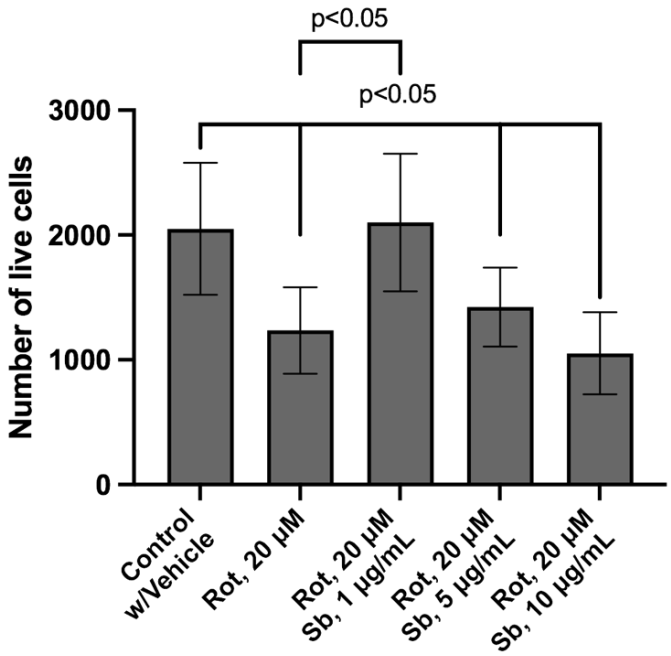



*Figure 5: Cell viability results obtained from AO/PI staining. The number of cells was the same as control in the 20 µM rotenone and 1 µg/mL S. brevibracteata group (n=3).*

## DISCUSSION

Being anti-inflammatory and antioxidant, flavonoids are suggested to be effective against neurodegeneration (Pérez-Hernández et al., 2016). In our study, *S. brevibracteata* n-butanol extract showed a statistically

significant effect in terms of neuroprotection when it is applied at a concentration of 1 µg/mL. However, at higher doses, it is toxic to the cells. Further investigations are required including increasing the sample sizes and repeating the experiments with different flavonoids that are purified from the *S. brevibracteata* extract. Also, changing the drug treatment times are necessary in order to evaluate the time dependency of this protection.

The effective concentration of 1 µg/mL was significant in the sense that in a previous study, the purified flavonoids from *S. brevibracteata* showed antioxidant IC50 values ranging from 0.57 to 3.48 µg/mL (Güvenç et al., 2010). However, in a study that investigates the lyophilized *S. brevibracteata* extract as a whole, it was found that the extract had 160 µg/mL antioxidant IC50 (Güvenç et al., 2005). The discrepancy in the effective concentrations may be explained with the fact that in the referred study, liposomes were used to evaluate the antioxidant effect of the extract.

To the best of our knowledge, *S. brevibracteata* has never been evaluated in terms of its effects on neurons. The results of our study are promising, even though the work is at a preliminary stage. With further investigations, a further understanding of the neuroprotection against PD is aimed.

## CONCLUSION

Our study yielded in an exciting finding, which is the observed protective effect of *S. brevibracteata* against rotenone-induced neurotoxicity modeled in differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Further investigations are required to understand whether and how *S. brevibracteata* can be employed in helping patients with Parkinson's Disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Boğaziçi University Research Fund Grant No. 13362.

## REFERENCES

Akkentli F, P. Tan Y and Saybasili H 2012. Common Pesticide Rotenone Interference with Neuronal Transmission in Hippocampus. American Journal of Biomedical Engineering 2, 212–217.

Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C and Comella JX 2002. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. Journal of Neurochemistry 75, 991–1003.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E and Offen D 2006. Anti-Inflammatory Drugs in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: Current State. Current Pharmaceutical Design 12, 3509–3519.

Güvenç A, Houghton PJ, Duman H, Coşkun M and Şahin P 2005. Antioxidant Activity Studies on Selected *Sideritis* Species Native to Turkey. Pharmaceutical Biology 43, 173–177.

Güvenç A, Okada Y, Akkol EK, Duman H, Okuyama T and Çalış İ 2010. Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*. Food Chemistry 118, 686–692.

Hare D, Ayton S, Bush A and Lei P 2013. A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. Frontiers in Aging Neuroscience 5.

Kim W-G, Mohney RP, Wilson B, Jeohn G-H, Liu B and Hong J-S 2000. Regional Difference in Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in the Rat Brain: Role of Microglia. The Journal of Neuroscience 20, 6309–6316.

Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Larson EB, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L and Mukadam N 2017. Dementia prevention, intervention, and care. The Lancet 390, 2673–2734.

Macready AL, Kennedy OB, Ellis JA, Williams CM, Spencer JPE and Butler LT 2009. Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. Genes & Nutrition 4, 227–242.

Pérez-Hernández J, Zaldívar-Machorro VJ, Villanueva-Porras D, Vega-Ávila E and Chavarría A 2016. A Potential Alternative against Neurodegenerative Diseases: Phytodrugs. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016, 1–19.

Raza C, Anjum R and Shakeel N ul A 2019. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. Life Sciences 226, 77–90.

Sezgin Z and Dincer Y 2014. Alzheimer's disease and epigenetic diet. Neurochemistry International 78, 105–116.

Sohn E 2018. A quest to stave off the inevitable. Nature 559, 18–120.

Solanki I, Parihar P, Mansuri ML and Parihar MS 2015. Flavonoid-Based Therapies in the Early Management of Neurodegenerative Diseases. Advances in Nutrition 6, 64–72.

Spagnuolo C, Moccia S and Russo GL 2018. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. European Journal of Medicinal Chemistry 153, 105–115.

Valls-Pedret C, Sala-Vila A, Serra-Mir M, Corella D, de la Torre R, Martínez-González MÁ, Martínez-Lapiscina EH, Fitó M, Pérez-Heras A, Salas-Salvadó J, Estruch R and Ros E 2015. Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. JAMA Internal Medicine 175, 1094–1103.

# Antioxidant activity of ascorbic acid on sodium fluoride induced cytotoxicity, oxidative damage, and apoptosis in Leydig cells

Banu Orta-Yilmaz[1], Yasemin Aydin[1]*

[*1] Istanbul University, Faculty of Science, Department of Biology, Istanbul, Turkey.

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

**Abstract**

Fluoride is a natural mineral that found abundantly in the earth's crust. Organic and inorganic fluoride elements are present in all water and soil sources, and people also take this element by consuming plants and animals as nutrients. Fluorine is in ionic form in drinking water and thus passes through the intestinal mucosa quickly. Fluoride affects male reproductive function. Endocrine disrupting effect of fluoride leads to decreased reproductive capacity, decreased testicular spermatozoa concentration, decreased testicular and auxiliary reproductive organs, decreased number of Leydig and Sertoli cells, and decreased activity of testosterone synthesis and steroidogenic enzymes in Leydig cells. In this study, cytotoxicity, oxidative damage, and apoptosis were analyzed after Leydig cells were treated with 1.5 ppm sodium fluoride (NaF) for 24 h, in addition to NaF to ascorbic acid (50 μM) as an antioxidant. The results of cytotoxicity showed that NaF significantly reduced cell viability and ascorbic acid ameliorate this effect of fluoride. We found that NaF cause oxidative damage via overproduction of lipid peroxidation in cell membrane. Ascorbic acid supplementation protects NaF-induced oxidative damage on Leydig cells. The findings demonstrated that ascorbic acid has protective effects of on apoptotic cell death and micronucleus formation caused by NaF in Leydig cells.

**Key Words:** Apoptosis, Ascorbic acid, Cytotoxicity, Leydig cells, Micronucleus, Sodium Fluoride.

## INTRODUCTION

Fluorine is the most reactive and electronegative non-metal element in the environment. Therefore, while it is never found as an element in nature, it is present in combination with metals and non-metals. It combines with many elements except oxygen and noble gases to form fluoride compounds. Fluoride is present in drinking water in ionic form and thus passively passes through the intestinal mucosa quickly (Shanthakumari et al., 2004). People are exposed to fluoride in terms of water, air, food, medicines, cosmetics, and industry. For example, high fluoride amounts have been reported in different foods, such as tea (4.97 ppm), canned fish (4.57 ppm), shellfish (3.36 ppm) and cooked wheat grain (1.02 ppm) (Ponikvar, 208). Fluoride also enters the body through fluorinated toothpastes. Toothpastes have become a larger source of fluoride than fluorinated water in the past 30 years in the world (Fawell et al., 2006).

In recent years, various clinical studies and animal experiments has shown that fluoride has acute, dental and skeletal fluorosis, renal effects, as well as carcinogenic and genotoxic effects (Kaminsky et al., 1990). There are many studies showing that fluoride has negative effects on male and female reproductive functions such as structural and functional sperm defects, decreased sperm count, disorders of reproductive hormone levels, epididymis and changes in the assisted reproductive glands and infertility (Chinoy et al., 1997; Izquierdo-Vega et al., 2008; Kim et al., 2015).

Sufficient amount of antioxidants should be consumed to eliminate oxidative stress, which caused by free radicals in the cells. Vitamins are organic substances necessary for the normal functioning of metabolic events in the body and maintaining a healthy state. Ascorbic acid (AA) is an essential dietary factor for human and animal reproduction and an antioxidant vitamin for all mammals. It can directly remove free radicals, as well as has indirectly a protective effect revising the antioxidant form of vitamin E (Kumar et al., 2000). AA is known as a special electron donor for enzyme systems in humans. Thanks to this feature, it accelerates hydroxylation reactions in most of the biosynthesis pathways (Levine, 1986). It also plays a role in important events such as stimulation of collagen synthesis, conversion of cholesterol to bile acids, carnitine synthesis, antibody formation and activation of T-lymphocytes, stress-inducing effect, stimulation of cell division and proliferation, protection of sperm from harmful oxidation and improving fertility (Dawson et al., 1990). AA

has three important biological activities in the reproductive system: it is necessary to perform the biosynthesis of collagen, the biosynthesis of steroid and peptide hormones, and to prevent or reduce oxidation of biomolecules (Luck et al., 1995).

It has been suggested that the number of sperm, which is the main problem of the male reproductive system, has decreased gradually in the last 50 years and its source may be environmental. Therefore, it is known that studies with Leydig cells, which are an important cell of the male reproductive system and produce the testosterone necessary for the continuity of spermatogenesis, are very important. The purpose of this study is to reveal the oxidative damage, apoptosis and genotoxicity that may occur on the TM3 Leydig cells which have a significant role in the male reproductive system via sodium fluoride (NaF) treatment by determining the cell viability, lipid peroxidation level, apoptosis rate, and formation of the micronuclei in the cell.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

The mouse Leydig cells (TM3) was purchased from American Type Culture Collection (Cat No. CRL-1714, ATCC, Manassas, VA, USA). Leydig cells were cultured in 50:50 DMEM/F12 culture medium containing 5% horse serum, 2.5% fetal bovine serum, 15 mM HEPES and 1% PSA in a humidified incubator containing 5% $CO_2$ and %95 air at 37ºC. Sodium floride (Sigma Chemical Company) was dissolved in medium containing 1% horse serum. 1.5 ppm which is acceptable daily intake concentration of sodium fluoride were prepared from stock solution (150 ppm) by diluting with medium containing 1% horse serum. In the experiments, the selected highly antioxidant concentration of ascorbic acid (AA) was 50 µM, which was used in *in vitro* studies and was known to be the average antioxidant concentration of AA. AA was dissolved in 1% horse serum and freshly prepared.

### Cell viability

Leydig cell viability was determined after administrations of NaF and AA by measuring formazan production from 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Leydig cell were seed in 96-well plate at $5x10^3$ cells/well in 100 µL experiment medium. After incubation period, 10 µl MTT I solution was added into each well and plates were incubated in $CO_2$ incubator at 37°C for 4 hours. Then, 100 µl MTT II solution (SDS) was added each well and incubated overnight in $CO_2$ incubator. The absorbance was read in ELİSA reader at 540 nm. Viability ratios of the control cells was assumed to be 100% and viability ratios of NaF and AA administrated groups was expressed as percentage according to control.

### Determination of lipid peroxidation

After treatments, cells ($5x10^5$) were harvested from 6-well plates and transferred into Tris-HCl buffer (pH:7.2). Then, the cells were sonicated using a ultrasonicator, and the resulting cell suspension was centrifuged at 14,000g. Supernatants were collected and used for determination of malondialdehyte which is lipid peroxidation product. In brief, the reaction mixture containing 1.0 ml of 0.15 M Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.3 ml of 10 mM KH2PO4, and 0.2 ml cell extract in a total volume of 2 ml. The tubes were incubated at 37ºC for 20 min with constant shaking. The reaction was stopped by the addition of 1 ml 10% trichloroacetic acid. The tubes were shaken well, 1.5 ml thiobarbituric acid (TBA) was added, and they were heated in a boiling water bath for 20 min. The tubes were centrifuged and the color was measured at 532 nm. The malondialdehyde (MDA) content of the sample is expressed as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

### Determination of Apoptosis

DNA binding dyes Hoechst 33342, a kind of blue-fluorescence dye, and propidium iodide (PI), a red-fluorescence dye, were used to detect differences between viable, apoptotic, and necrotic cells. The staining pattern resulted from the simultaneous use of these dyes makes it possible to distinguish normal, apoptotic, and dead cell populations by fluorescence microscopy. Leydig cells were cultured in 24-well plates with $1x10^4$ cells per well and treated with NaF and AA as indicated. After the experimental periods, the cells were washed with PBS (1M) solution. Then, 20 µl PI (1 mg/ml Propidium Iodide) and 20 µl Ho342 (1 mg/ml Hoechst 33342) solution was prepared by dissolving in 3960 µl PBS. From the prepared solution 0,2 ml was added to each well and incubated for 15-30 minutes at 37°C. After the incubation, the cells were washed with PBS for 1-2 times and examined under the fluorescent microscope. Cells were examined with UV filter via Olympus IX71 fluorescent attachment microscope and photographed in series with equal intervals by Olympus DP72 video camera. The ratio of viable, apoptotic and dead cells were calculated.

### Cytokinesis-Blocked Micronucleus (CBNM) Assay

The analysis of micronucleus in binucleated cells was carried out by following the method described by Fenech (2007) with some modifications. Leydig cells were seeded in 6-well plates with density of $5x10^5$ cells per well. After the exposure to NaF and AA, experimental medium was removed, and both control and treated groups were incubated for a total 20 h at 37 °C with cytochalasin B (final concentration of 4 µg/ml) in order to block cytokinesis and obtain binucleated cells. At the end of the exposure time, cells were harvested and centrifugation. Then, cell pellet was resuspended in a hypotonic solution of 0.075 M KCl with one drop of 1% formaldehyte for 5 min at 37 °C. After this step, the cells were fixed in a cold fixative called Cornay's reagent (3:1 methanol/glacial acetic acid) and cell suspension were centrifuged again. After centrifugation, the cells were fixed further two times in a cold solution consisting of methanol-glacial acetic acid (3:1 v/v) at room temperature (22 °C ± 1 °C). Finally, the centrifuged cells resuspended with Cornay's reagent and were dropped onto clean slides and then air-dried. Air-dried slides were stained with 4% Giemsa solution in Sorensen Buffer (pH 6.8) for 8 min and washed with water. For the evaluation of micronucleus frequency, 1000 binucleated cells (BN) with well-preserved cytoplasm were scored using a microscope with a magnification of 40X according to Eastmond and Tucker (1989). The total number of micronucleus present in 1000 BN cells were used as indices of genotoxicity. To investigate the nuclear division index (NDI), the following formula was used: $NDI = \frac{(1\times N1)+(2\times N2)+(3\times N3)+(4\times N4)}{Total\ number\ of\ cells}$

### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and analysis of variance (ANOVA) was used for comparisons among all groups. Data distribution was verified for normality using the Shapiro-Wilk test. Differences between groups were analyzed by a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. The results were expressed as mean ± standard error mean and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

## RESULTS

### The effects of sodium fluoride and ascorbic acid on Leydig cells viability

The figure 1 showed that Leydig cell viability decreased to 76% ($p< 0.05$) for 24 hours after exposure to NaF (1.5ppm). The cell viability increased to 90% ($p< 0.05$) after AA (50 µM) treatment compared with NaF group.

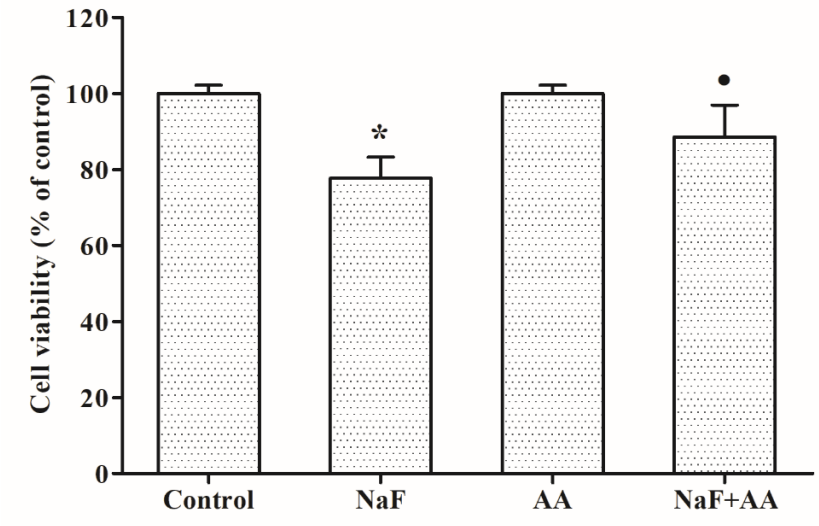



**Figure 1.** Effects of NaF and AA on cell viability of Leydig cells *in vitro*. Each bar denotes mean (±SEM) of three independent experiments carried out in triplicates. Significance at *p<0.05. (*) compared with

### Ascorbic acid prevents sodium fluoride-induced lipid peroxidation in Leydig cells

The levels of MDA, a lipid peroxidation product, were increased significantly after 1.5 ppm NaF treatment ($p<0.05$). Addition of 50 µM AA decreased lipid peroxidation level compared with only NaF group in Leydig cells (Figure 2).

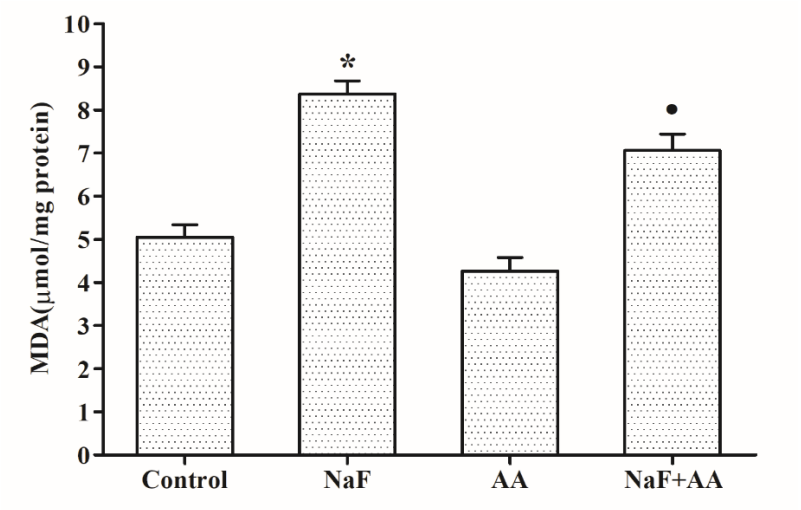



**Figure 2.** Effects of NaF and AA on lipid peroxidation in Leydig cells *in vitro*. Each bar denotes mean (±SEM) of three independent experiments carried out in triplicates. Significance at *p<0.05. (*) compared with control, (•) compare with AA.

**Ascorbic acid ameliorates sodium fluoride-induced apoptosis in Leydig cells**

In the current study, we assessed cell death with PI/Hoechst 33342 double fluorescent staining. The percentages of viable, apoptotic and dead cells were significantly altered in NaF and AA treated groups compared with control group (p<0.05) (Table 1). After treatment with 1.5 ppm NaF, the number of nuclei stained with bright blue decreased to 76.7% in Leydig cells, while the number of condensed and fragmented nuclei stained with dark blue expressing apoptosis increased to 15.8% in Leydig cells. PI-positive cells were significantly increased to 7.5% after NaF treatment. Addition of AA decreased to 3.8% dead cells and 7.3% apoptotic cells induced by NaF in Leydig cells (Figure 3).

**Table 1**. Effects of NaF and AA co-treatment on viable, apoptotic and dead cells.

| Groups | Viable cells | Apoptotic cells | Dead cells |
|---|---|---|---|
| Control | 95.1 ± 0.4 | 4.6 ± 0.7 | 0.3 ± 0.1 |
| AA | 98.7 ± 0.2 | 1.2 ± 0.6 | 0.1 ± 0.5 |
| NaF | 76.7 ± 0.9 | 15.8 ± 0.3* | 7.5 ± 0.2* |
| NaF+AA | 88.9 ± 0.3 | 7.3 ± 0.5• | 3.8 ± 0.8• |

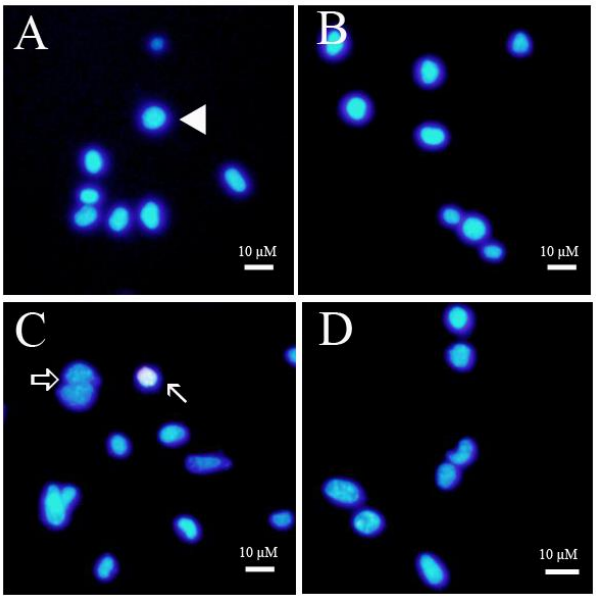



**Figure 3.** Viable, apoptotic and dead cell findings in 24 h NaF and AA exposed TM3 Leydig cells. (A) Control, (B) AA, (C) NaF, (D) NaF+AA. ∇: viable cell, ⇒: apoptotic cell, →: dead cell. NaF: Sodium Fluoride, AA: Ascorbic Acid.

**Frequency of micronucleus (MN) and nuclear division index after treatment of NaF and AA**

The frequency of MN in cultured Leydig cells after treatment with NaF increased to 1.3 MN/1000 BN. When AA treated together with NaF, the frequency of MN decreased to 0.8 MN/1000 BN. When the nuclear division index results were compared, the nuclear division index diminished significantly in NaF treated group and addition of AA ameliorates NaF-induced nuclear division index result in Leydig cells (Table 2). Figure 4 shows types of nuclear abnormalities observed in the micronucleus test.

**Table 2.** Micronucleus frequency and nuclear division index in NaF and AA induced Leydig cells.

| Groups | ‰ Micronucleus | Nuclear division index |
|---|---|---|
| **Control** | 0.5 ± 0.2 | 1.45 ± 0.1 |
| **Control+AA** | 0.3 ± 0.1 | 1.64 ± 0.2 |
| **NaF** | 1.3 ± 0.5 | 1.39 ± 0.1* |
| **NaF+AA** | 0.8 ± 0.3 | 1.53 ± 0.1• |
| **Positive control ($H_2O_2$)** | 48.03±1.4 | 1.25 ± 0.3 |

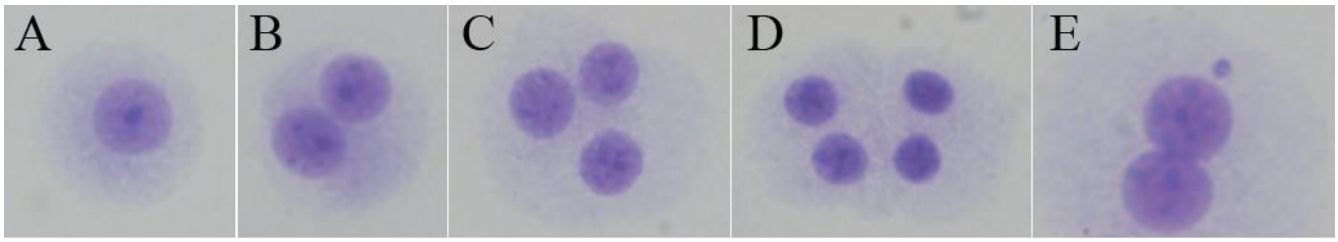



**Figure 4.** Leydig cells exposed to NaF and AA and their mixture, and types of nuclear abnormalities observed in the micronucleus test (A) Mononucleated cell, (B) Binucleated cell, (C) Trinucleated cell, (D) Tetranucleated cell (E) Binucleated cells with micronuclei.

**DISCUSSION**

In our daily life, fluoride, which we are exposed to both through water and food, is harmful to human health (Chinoy et.al., 2004). Several studies have demonstrated that fluoride as an environmental toxicant causes metabolic, functional, and structural tissue and cellular damage. It is known that fluoride taken in large quantities negatively affects the male reproductive system (Zhang et.al., 2006; Gupta et.al., 2007; Izquierdo-Vega et.al., 2008). Thus, understanding the relation between cytotoxicity and infertility caused by sodium fluoride has become crucial in recent years. It is known that a sufficient amount of antioxidant should be consumed to prevent oxidative stress caused by environmental toxicants. In this study, the effect of ascorbic acid against fluoride-induced lipid peroxidation, apoptosis and genotoxicity in Leydig cells was revealed.

Previous studies have reported that NaF exposure decrease cell viability in various cells including Leydig cells (5, 10 and 20 ppm NaF for 24, 48, 72, 96 and 120 h in primary Leydig cells and 2 and 16 ppm NaF for 24, 48 and 72 h in TM3 Leydig cell line), Sertoli cells (6, 12, and 24μg/ml NaF for 24 h in cultured primary rat Sertoli cells and 4 and 20 ppm NaF for 24 and 48 h in TM4 Sertoli cell line), human lung BEAS-2B (0.25, 0.5, 1, 2, and 4 mmol/L NaF for 24, 48 and 72 h), lung epithelial cells (A549) (5 mM NaF for 24 h), primary rat ameloblast (0.4, 0.8, 1.6, 3.2, and 6.4 mM NaF for 24, 48 and 72 h) and F9 embryonic carcinoma cells (1, 2 and 4 mM NaF for 12 h) dose- and time- dependent manner (Song et al., 2014; Yang et al., 2015; Yilmaz and Erkan 2015; Ameeramja et al. 2016; Wang et al. 2016; Aydin 2017; Ying et al. 2017; Peng et al., 2019). Some studies have shown that various antioxidant molecules such as tamarind seed (Ameeramja et al. 2016), vitamin C (Yilmaz and Erkan, 2015; Peng et al., 2019), vitamin A, D, E, C (Yüksek et al., 2017) reduce the toxic effects of NaF on cell viability in different cells. The present *in vitro* study indicated a decrease in TM3 Leydig cell viability at a 1.5 ppm concentration of NaF similar to other cells that exposed NaF with various concentrations. This study also reported that the addition of AA in a concentration of 50 μM showed an improvement in the reduction of NaF-induced cell viability in Leydig cells.

One of the markers of oxidative stress-related cell membrane damage is that peroxidation of cell membrane lipids. Various in vivo studies reported a significant increase in lipid peroxidation level in liver, kidney, heart, brain, testis and spermatozoa after NaF administration (Izquierdo-Vega et al., 2008; Madhusudhan et al., 2009; Nabavi et al., 2012a; Rao and Bhatt, 2012; Mittal et al., 2018). Several *in vitro* studies showed that NaF-induced lipid peroxidation depends on concentration- and time- dependent manner in Sertoli cells (Yilmaz and Erkan, 2015), Leydig cells (Aydin, 2017), human hepatocyte (Wang et al., 2004), primary hippocampal neurons (Zhang et al., 2007), lung epithelial cells, A549 (Ameeramja et al. 2016). Some studies suggested that consuming adequate amount of antioxidant such as vitamin C and E (Chinoy et al., 2004; Günet et al., 2007; Yilmaz and Erkan, 2015), tamarind seed (Ameeramja et al. 2016), selenium (Wang et al., 2004), oleanolic acid (Sarkar et al., 2014), silymarin (Nabavi et al., 2012a), quercetin (Nabavi et al., 2012b), zinc and propolis (Madhusudhan et al., 2009) can minimize damage to NaF-induced cell membrane. In this study, 1.5 ppm NaF treatment can cause oxidation of membrane lipids in Leydig cells parallel to results of other studies. Moreover, our results showed that administration of ascorbic acid reduce lipid peroxidation products in Leydig cells.

Exposure to environmental toxins leads to the apoptosis with the degradation of lipid and protein structures through the formation of reactive oxygen species (ROS) in cells. Apoptosis is a well-characterised process presenting distinctive morphological and biochemical features and can be triggered by a variety of extrinsic and intrinsic signals (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016). There are several studies on NaF-induced apoptosis in various tissues and cells (Güney et al., 2007; Zhang et al., 2007; Xu et al., 2011; Yilmaz and Erkan 2015). Some *in vitro* reports suggested that NaF induced apoptosis at a concentration of 80 µg/mL in human primary hepatocyte (Wang et al., 2004), at a concentrations of 6000 µM and 5000 µM in rat renal epithelial (NRK-52E) cells and osteoblast (hFOB 1.19) cells respectively (Yüksek et al., 2017), at concentrations of 4 and 20 ppm for 24 and 48 h in Sertoli (TM4) cells (Yilmaz and Erkan, 2015), at a concentration of 5 mM NaF for 24h in A549 lung epithelial cells (Ameeramja et al. 2016), at a concentration of 3.2 mM NaF for 24h in rat primary ameloblasts (Wang et al., 2016), at concentrations of 0.5, 1 and 2 mM NaF for 48 h in human lung BEAS-2B cell line (Ying et al., 2017), at concentrations of 1, 2 and 4 mM NaF for 12 h in F9 embryonic carcinoma cells (Peng et al., 2019). Various antioxidant molecules such as selenium, vitamin A, D, E and C, tamarind seeds are highly effective in preventing NaF-induced apoptosis (Wang et al., 2004; Yüksek et al., 2017; Yilmaz and Erkan 2015; Ameeramja et al. 2016; Peng et al., 2019). The current study showed that ascorbic acid prevents NaF-induced apoptosis in Leydig cells similar to study conducted with Sertoli cells (Yilmaz and Erkan 2015), F9 embryonic carcinoma cells (Peng et al., 2019), renal epithelial (NRK-52E) cells and osteoblast (hFOB 1.19) cells (Yüksek et al., 2017).

Genotoxicity is defined as genetic damage resulting from the oxidative DNA attack by ROS (Schins and Knaapen 2007). The data concerning genetic toxicity of environmental toxicants has been collected from various assays including 8-OH guanin, micronucleus (MN), chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and comet assay (Pournourmohammadi and Abdollahi, 2011). Some reports showed that NaF induced in MN formation in rat erythrocytes (Campos-Pereira et al., 2017), in MN formation in erythrocytes and structural chromosome aberrations in bone marrow cells at concentrations of 4, 12, 20 mg/L NaF for 30 days (Manivannan et al., 2013), in S-phase cell-cycle arrest and DNA damage in primary rat hippocampal neurons at concentrations of 40 mg/L and 80 mg/L fluoride (Zhang et al., 2008), in DNA strands break and significant increase in comet tail length at concentrations of 0, 0.5, 1, 2, and 3 mmol/L NaF in isolated osteoblast cells for 24 h (Zhang et al., 2006). A study conducted with human showed that high fluoride level via drinking water caused increased MN rate and sister chromatid exchanged frequency (Wu and Wu, 1995). Another study revealed that school children exposed to high fluoride concentrations had genotoxic effects in the oral epithelium (Vazquez-Alvarado et al. 2012). Previous study showed that cell cycle proliferative index significantly decreased and sister chromatid exchanges increased significantly at concentrations of 17, 34, and 54 µM NaF or 72 h in human peripheral blood lymphocyte cells (Rao and Thakura, 2013). The addition of antioxidants such as selenium (Wang et al., 2004), vitamin E and C (Oner et al., 2020) has been shown to be protective against NaF-induced DNA damage. In our study demonstrated that ascorbic acid supplementation protect the cell MN formation and increase nuclear division index similar the studies above.

## CONCLUSION

The result of the present study showed that fluoride caused cellular cytotoxicity by decreasing cell viability and oxidative damage through overproduction of lipid peroxidation in the cell membrane. Ascorbic acid supplementation protects NaF-induced cytotoxicity and oxidative damage on Leydig cells. In addition, the findings demonstrated that ascorbic acid has protective effects of on apoptotic cell death and micronucleus formation caused by NaF in Leydig cells.

## REFERENCES

Ameeramja J, Panneerselvam L, Govindarajan V, Jeyachandran S, Baskaralingam V, Perumal E 2016. Tamarind seed coat ameliorates fluoride induced cytotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis in A549 cells. Journal of Hazardous Materials, 301: 554-565.

Aydin Y 2017. Exposure to sodium fluoride via drinking water cause cytotoxicity and oxidative damage in Leydig cells. Trakya University Journal of Natural Sciences, 18(2): 115-122.

Campos-Pereira FD, Lopes-Aguiar L, Renosto FL, Nogueira GAS, Costa EFD, Pulz RB, Silva-Zacarin EC, Oliveira CA, Pigoso AA, Severi-Aguiar GDC 2017. Genotoxic effect and rat hepatocyte death occurred after oxidative stress induction and antioxidant gene downregulation caused by long term fluoride exposure. Chemico-Biological Interactions 264: 25-33.

Chinoy NJ, Shukla S, Walimbe AS, Bhattacharya S 1997. Fluoride toxicity on rat testis and cauda epididymal tissue components and its reversal. Fluoride, 30(1):41-50.

Chinoy N, Sharma A, Patel T, Memon R, Jhala D 2004. Recovery from fluoride and aluminium induced free radical liver toxicity in mice. Fluoride 12: 14-16.

Dawson EB, Harris WA, Powel LC 1990. Relationship between ascorbic asid and male fertility, In"Aspects of Some Vitamins, Minerals and Enzymes in Health and Disease", (Ed by GH Bourne), World Review of Nutrition and Dietetic, 62, 1-26, Kargel Basel.

Eastmond DA, Tucker JD 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. Environmental and Molecular Mutagenesis, 13(1): 34-43.

Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y. 2006. Fluoride in drinking-water. London: WHO.

Fenech M 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols, *2*(5): 1084.

Gupta R, Khan T, Agrawal D, Kachhawa J 2007. The toxic effects of sodium fluoride on the reproductive system of male rats. Toxicology and Industrial Health 23:507-513.

Güney M, Oral B, Demirin H, Karahan N, Mungan T, Delibas N 2007. Protective effects of vitamins C and E against endometnal damage and oxidative stress in fluoride intoxication. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 34: 467-74.

Izquierdo-Vega JA, Sánchez-Gutiérrez M, Del Razo LM 2008. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. Journal of Toxicology Applied and Pharmacology, 230(3):352-7.

Kaminsky LS, Mahoney MC, Leach J, Melius J, Jo Miller M 1990. Fluoride: benefits and risks of exposure. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 1(4): 261-281.

Kim J, Kwon WS, Rahman MS, Lee JS, Yoon SJ, Park YJ, You YA, Pang MG 2015. Effect of sodium fluoride on male mouse fertility. Andrology, 3(3): 544-551.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL 2000. Temel Patoloji, (Basic Pathology, Çev. Ed. Çevikbaş, U.), 6.Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 9789754206555

Levine M, 1986. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic asid, The New England Journal of Medicine, 314 (14): 892-902.

Luck MR, Jeyaseelan I, Scholes RA 1995. Ascorbic acid and fertility, Biology of Reproduction, 52, 262–266.

Madhusudhan N, Basha PM, Begum S, Ahmed F 2009. Fluoride-induced neuronal oxidative stress and its amelioration by antioxidants in developing rats. Fluoride, 42(3): 179.

Manivannan J, Sinha S, Ghosh M, Mukherjee A 2013. Evaluation of multi-endpoint assay to detect genotoxicity and oxidative stress in mice exposed to sodium fluoride. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 751(1): 59-65.

Mittal M, Chatterjee S, Flora SJS 2018. Combination therapy with vitamin C and DMSA for arsenic–fluoride co-exposure in rats. Metallomics, 10(9), 1291-1306.

Nabavi SM, Nabavi SF, Moghaddam AH, Setzer WN, Mirzaei M 2012a. Effect of silymarin on sodium fluoride-induced toxicity and oxidative stress in rat cardiac tissues. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 84(4): 1121-1126.

Nabavi SM, Nabavi SF, Habtemariam S, Moghaddam AH, Latifi AM 2012b. Ameliorative effects of quercetin on sodium fluoride-induced oxidative stress in rat's kidney. Renal Failure, *34*(7): 901-906.

Oner AC, Dede S, Yur F, Onera A 2020. The effect of vitamin c and vitamin e on DNA damage, oxidative status, and some biochemical parameters in rats with experimental fluorosis. Fluoride, *53*.

Peng W, Xu S, Zhang J, Zhang Y 2019. Vitamin C attenuates sodium fluoride-induced mitochondrial oxidative stress and apoptosis via Sirt1-SOD2 pathway in F9 cells. Biological Trace Element Research, 191(1), 189-198.

Ponikvar M 2008. Exposure of humans to fluorine and its assessment. Fluorine and Health. Elsevier, 487-549.

Pournourmohammadi S, Abdollahi M 2011. Toxicity and Biomonitoring: Gene expression. In: Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology, Satoh, T. and R. Gupta, (Eds.). Wiley, Hoboken, NJ., USA.

Rao MV, Bhatt RN 2012. Protective Effect of Melatonin on Fluoride-Induced Oxidative Stress and Testicular Dysfunction in Rats. Fluoride, 45: 116-124.

Rao MV, Thakura SB 2013. Effects of melatonin and amla antioxidants on fluoride induced genotoxicity in human peripheral blood lymphocyte cells. Fluoride 46(3): 128-134.

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1863(12): 2977-2992.

Sarkar C, Pal S, Das N, Dinda B 2014. Ameliorative effects of oleanolic acid on fluoride induced metabolic and oxidative dysfunctions in rat brain: experimental and biochemical studies. Food and Chemical Toxicology, 66: 224-236.

Schins RP, Knaapen AM 2007. Genotoxicity of poorly soluble particles. Inhalation Toxicology, 19: 189-198.

Shanthakumari D, Srinivasalu S, Subramanian S 2004. Effects of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats, Toxicology, 204: 219-228.

Song G, Wang RL, Chen ZY, Zhang B, Wang HL, Liu ML, Gao JP, Yan XY 2014. Toxic effects of sodium fluoride on cell proliferation and apoptosis of Leydig cells from young mice. Journal of Physiology and Biochemistry 70:761-768.

Vazquez-Alvarado P, Melendez-Ocampo A, Ortiz-Espinosa RM, Muntilde S 2012. Genotoxic damage in oral epithelial cells induced by fluoride in drinking-water on students of Tula de Allende, Hidalgo, Mexico. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences 4(8): 123-129.

Wang AG, Xia T, Ru R, Yuan J, Chen X, Yang K, Yang K 2004. Antagonistic effect of selenium on oxidative stress, DNA damage, and apoptosis induced by fluoride in human hepatocytes. Fluoride 37:107-116.

Wang L, Zhu Y, Wang D 2016. High-Dose Fluoride Induces Apoptosis and Inhibits Ameloblastin Secretion in Primary Rat Ameloblast. Biological Trace Element Research 174:402-409.

Wu DQ, Wu Y 1995. Micronucleus and sister chromatid exchange frequency in endemic fluorosis. Fluoride 28(3): 125-127.

Xu B, Xu Z, Xia T, He P, Gao P, He W, Zhang M, Guo L, Niu Q, Wang A 2011. Effects of the Fas/Fas-L pathway on fluoride-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. Environmental Toxicology, 26(1): 86-92.

Yang Y, Huang H, Ba Y, Cheng XM, Cui XL 2015. Effect of oxidative stress on fluoride-induced apoptosis in primary cultured Sertoli cells of rats. International Journal Environmental Health Research 25:1-9.

Yilmaz BO, Erkan M 2015. Effects of Vitamin C on Sodium Fluoride-Induced Oxidative Damage in Sertoli Cells. Fluoride 48:241-251.

Ying J, Xu J, Shen L, Mao Z, Liang J, Lin S, Yu X, Pan R, Yan C, Li S 2017. The Effect of Sodium Fluoride on Cell Apoptosis and the Mechanism of Human Lung BEAS-2B Cells In Vitro. Biological Trace Element Research, 179(1): 59-69.

Yüksek V, Dede S, Taşpınar M, Cetin S 2017. The effects of vitamins A, D, E, and C on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-treated renal and osteoblast cell lines. Fluoride, 50(3): 300-313.

Zhang Y, Sun X, Sun G, Liu S, Wang L 2006. DNA damage induced by fluoride in rat osteoblasts. Fluoride 39(3): 191-194.

Zhang M, Wang A, He W, He P, Xu B, Xia T, et al. 2007. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. Toxicology, 236(3): 208-16.

Zhang M, Wang A, Xia T, He P 2008. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-κB in primary cultured rat hippocampal neurons. Toxicology Letters 179(1): 1-5.

# *Ecoli* Nissle 1917- history, probiotic affect and medical use

Hacer Aslan Canberi[1*], Pınar Şanlıbaba[2]

[1*] Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey

[2]Ankara University, Food Engineering Department, Ankara, Turkey

hacer_as87@hotmail.com

## Abstract

Probiotics are non-pathogenic living microorganisms that, when taken in sufficient amounts, have positive effects on the health of the host. Among the gram negative microorganisms with probiotic properties, *E.coli* Nissle 1917 (EcN) strain is one of the strains studied extensively today. This strain was isolated by Alfred Nissle in 1917, from stool of soldiers during the First World War, in the camp of the Balkan peninsula. While the diarrhea due to infection is expected to develop in the remaining soldiers in this region, the soldiers were found to be healthy. This result led Nissle to think that the *E. coli* strain, which has an antogonistic effect that protects the soldiers from infection, is present in the intestines of the soldiers and Nissle proved this idea by laboratory work. For over 100 years, the EcN strain has been used as an active pharmaceutical ingredient in a licensed medicinal product distributed in Germany and other countries. This strain has the effect of regulating intestinal diseases such as diarrhea, ulcerative colitis, Crohn's disease, irritable bowel syndrome, immune system regulating effect and infection prevention effect. The probiotic success of this is due to some of its characteristics that are important for survival, colonization ability, persistence and therapeutic efficacy in the intestinal ecosystem. The H1-type flagella is characterized by mobility, the ability to colonize due to its specific interaction with the mucin layer in the flagella, antagonistic activity against foreign microbes due to antimicrobial microsins, and strain-specific surface structures of EcN, which form the probiotic mechanisms of EcN.

**Key words:** *E. coli Nissle* 1917, EcN, probiotics

## INTRODUCTION

Probiotics are defined as living bacteria that provide a health benefit to the host when administered in sufficient quantities (FAO 2006). The benefits of some bacteria and the basics of these beneficial properties were first and thoroughly investigated by Eli Metchnikoff. In the early 20th century, Metchnikoff discovered that "healthy bacteria", especially lactic acid bacteria (LAB), can have a positive effect on the digestive and immune system. His research enabled Eli Metchnikoff to win the Nobel Prize and to be recognized as the ancestor of probiotics today (Behnsen et al., 2013).

The term probiotic is derived from Greek and means "pro-biotica", meaning "for life". Different interpretations are suggested by different people about the word probiotic and its origin. In 1954, Vergin stated that the concept of probiotics was defined as " foods with health promoting properties beyond nutritional values " by doctor and dietitian Werner Kollath shortly after the Second World War (Sonnenborn and Schulze, 2009). In 1965, it was used by Lily and Stillwell as "substances secreted by a microorganism and inducing the development of other microorganisms" and in this definition, contrasted the term antibiotics (Schrezenmei and Vrese, 2001). Parker, on the other hand, was the first to use probiotics as used today, and he described probiotics as "organisms and substances that contribute to the intestinal microbial balance". Based on this definition of Parker, in 1989, Fuller redefined probiotics as a "live microbial feed supplement that beneficially affects the host animal by improving gut microbial balance" (Sonenborn and Schulze, 2009).

Microorganisms with probiotic bacteria feature do not show virulence against the host cell and / or do not contain antibiotic resistance cassettes in their chromosomes. However, they create a negative environment for pathogenic microorganisms through various mechanisms that promote the integrity of the gut defense barrier by normalizing intestinal permeability, modulating the Ig function released from the gut, controlling the intestinal inflammatory response, and balancing cytokine secretion. In addition to these features, probiotics; It also has important functions such as preserving the microecology of the gastrointestinal flora, bacteriocin production, modification of toxins produced by pathogenic microorganisms, and stimulating epithelial mucin

production (Mcnabb and Isakow, 2008). These properties of probiotic bacteria and / or yeasts provide an insight into the issue of how food preservation, microbiological interactions, host cell health and diseases can be treated (Mc Farland, 2015). Probiotics due to their properties, such as understanding that some commensal microorganisms can produce antimicrobial agents to suppress the growth of other microorganisms or colonize the gut better than pathogenic bacteria, and lack of resistance; It is of great interest as an alternative to antibiotics (Bury et al., 2018). In addition, the responses of being able to benefit from these strains more efficiently in the fields of food and health started to be questioned. Over time, probiotic supplemented foods and supplement capsules were developed and started to be used.

The non-pathogenic *E.coli* Nissle 1917 (EcN) strain is one of the microorganisms that show probiotics. This strain has been used as a licensed probiotic drug for chronic inflammatory, functional and infectious bowel diseases in Europe for more than 100 years (Henker et al., 2008).

## HISTORY AND ISOLATION OF EcN

*E. coli* Nissle 1917 (EcN) strain is present in the content of Mutaflor, a commercial product used in the clinical treatment of various intestinal diseases in many European countries, especially Germany (Konturek et al., 2009). This drug was developed shortly after Alfred Nissle, a German bacteriologist, isolated and identified EcN in 1917. For more than 100 years, the EcN strain has been used as an active pharmaceutical ingredient in a licensed medicinal product, known as Mutaflor, distributed in Germany and other countries.

*E. coli* Nissle 1917 (EcN) strain was isolated from the feces of a German soldier by Alfred Nissle during World War I in 1917. This soldier attended a military camp in the Dobrudja region in the Balkans and was exposed to a Shigella strain there. This soldier, which was stationed in the Dobrudja region for a while and then heavily contaminated by Shigella, did not suffer from diarrhea or another bowel disease, unlike other soldiers (Altundaş et al., 2017). On this occasion, Nissle suspected that this soldier had an E. coli strain that could prevent diarrhea from catching diarrhea and had an antagonistic effect against Shigella. This result led Nissle's E. coli strain, which has an antagonistic effect to protect soldiers from infection, in the intestines of soldiers, and that Nissle proved this idea through laboratory work, and this was proved by laboratory work (Shultz, 2008, Schaldaferri et al., 2016). This strain was named as *E.coli* Nissle 1917 (EcN) strain, referring to Alfred Nissle's name.

## PROBIOTIC MECHANISM OF EcN

In order for a microorganism to be used as a probiotic, organisms must have certain properties. One of the most important of these features is the condition that it is not pathogenic or toxic to the host cell. In addition to these features, it does not contain antibiotic resistance genes, it is resistant to low pH and bile salts, it has adhesion and colonization property to host cell epithelium, and it maintains its viability and activity feature (Koçak et al., 2016).

*Escherichia coli* Nissle 1917 is a gram-negative bacteria belonging to the family Enterobacteriaceae. Bacterial O, K and H antigens are classified and identified according to their serogroups. The O antigen refers to carbohydrates that are part of the lipopolysaccharide, the capsule-related antigen that allows the K antigen to adhere, and the flagella-related antigen the H antigen is responsible for movement. The EcN strain is in the serotype O6: K5: H1 and shows a highly heterogeneous structure. Serogroup O6 gives bacteria a diarrheal and uropathogenic feature (Shultz, 2008). As a result of genetic and functional studies, EcN was not found to produce virulence factors. EcN, a specific lipopolysaccharide (LPS) makes EcN immunogenic and non-immunotoxic. In addition, EcN has been shown to strongly induce expression and tight membrane-mediated distribution of tight-binding proteins and antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells. Another feature of EcN is the extracellular K5 capsule, which is important for adhesion and colonization (Dunne et al., 2017). Bacteria are reported to grow preferably in solid tumors, and this feature probably leads to preferential growth in the tumor microenvironment by promoting the targeting of EcN to the tumor (Yu et al., 2019, Böhm and Kruis, 2006, Grozdanov et al., 2004, Sun et al., 2005, Altenhoefer et al., 2004, Boudeau et al.,2003, Kruis et al., 2004).

In EcN, there are many defined factors called "fitness factors" that enable the microorganism to adapt to the environment. These factors include the fimbriae, which provide adhesion to the intestinal epithelial cell, and thus allow permanence in the intestine, survive in the intestine and provide an advantage to the bacteria in case of hunger, and microsine production that provides the ability to exhibit antagonistic effect against various pathogenic microorganisms (Böhm and Kruis, 2006, Grozdanov et al., 2004, Sun et al., 2005, Altenhoefer et al., 2004, Boudeau et al., 2003, Kruis et al., 2004). Microsines were noticed shortly after identification of the EcN strain. This strain was found to produce colic with low molecular mass. Nissle 1917 strain expresses two different microsine. These two microsines produce cellulose completely independently from temperature and have an iron intake system (Altenhoefer et al., 2004).

It has been determined that probiotic EcN forms biofilm at 37 ° C and has the ability to create biofilm even at lower temperatures (<30 ° C) unlike other E. coli strains. The ability to form biofilm is an important factor in the selection of probiotic microorganism. The ability to form biofilm allows the probiotic to cling to the intestinal epithelium after it is taken orally, to multiply and form flora. The first stage of the biofilm is holding, thanks to the fimbriae in EcN (Sonnenborn and Schulze, 2009, Hancock et al., 2010, Altundaş et al., 2017).

The probiotic success of mutaflor is due to some of the properties of EcN that are important for survival, colonization ability, permanence and therapeutic efficacy in the intestinal ecosystem. However, H1 type flagella is characterized by mobility, ability to colonize due to its specific interaction with the mucin layer in flagella, antagonistic activity against foreign microbes due to antimicrobial microsins, and strain-specific surface structures of EcN.

**USE OF EcN IN MEDICINE**

Studies show that EcN has an effect in the treatment of many diseases such as diarrhea, ulcerative colitis, Crohn's disease, irritable (irregular) intestinal syndrome, immune system regulating effect and infection prevention effect.

Given the potential mechanisms behind the enhancement of infection or chronic inflammation, and considering the hypotheses affecting inflammatory bowel disease (IBD), it can be said that increased mucosal permeability may play an important role in maintaining a chronic inflammatory condition (Faubion and Sandborn, 2000).

Studies have shown that EcN strain is a good biofilm producer. This allows the bacteria to attach to the intestinal epithelium and colonize it, preventing many competitive pathogenic microorganisms from attaching to the intestinal epithelium. Since strong and significant inhibitory effects have been observed in EcN adhesion and invasion in co-infection and pre-infection studies, probiotic treatment with this bacterium is thought to have a curative effect on Crohn's Disease (Boudeau et al., 2003).

Crohn's disease and ulcerative colitis are the two main inflammatory bowel diseases. Crohn's disease (CD) is a common chronic disease that affects the gastrointestinal tract and is thought to develop due to an abnormal immune response to the gut microbes of a genetically susceptible host. CD disease can affect any part of the gastrointestinal tract, from mouth to anus. Ulcerative colitis (UC) is an inflammation of the layer that covers the inside of the large intestine. This disease is called ulcerative colitis, as ulcers are formed in the area of inflammatory changes. While the rectum and left colon (the last part of the large intestine) are most commonly affected in the large intestine, other parts of the digestive tract are not (CDC, Xavier and Podolsky, 2007). IBD is a long-term disease and usually does not disappear completely. Although this chronic disease significantly affects the quality of life, there are methods to alleviate disease exposure (CDC). Studies show that EcN strain can be successful in the treatment of Crohn's and ulcerative colitis.

In their study Malchow et al. examined the effect of EcN on Crohn's disease, they conducted a randomized double-blind study in 75 patients suffering from active Crohn's disease. He prescribed EcN supplements or placebo to patients and followed them for 1 year. He found recurrence rates at the end of the period and observed that the recurrence rate was 30% in patients receiving EcN and 70% in the placebo group (Malchow, 1997).

One of the first studies related to the use of ulcerative colitis (UC) and EcN was performed by Kruis et al. A randomized study investigating the effect of mesalamine (500 mg) and EcN (200 mg; 5x1010 CFU / mg) on

120 patients was conducted and recurrence rates were investigated 3 months after treatment. Both drugs have been successful in treating disease. However, there was no significant difference between the recurrence rates between these two groups. This result; Considering antibiotic resistance, it suggests that probiotic use is safer in the treatment of ulcerative colon (Curro et al.,2017, Kruis et al., 2004).

There are different studies done with the prevention and treatment of probiotics UC. The results of these studies have shown that the use of EcN is very important in the prevention and / or treatment of mild and moderate UC (Chibbar and Dieleman, 2015).

The use of EcN has been studied in various studies in active and inactive UC. EcN supplementation has been shown to reduce myeloperoxidase activity and reduce levels of TNF-α, interferon (IFN) -g and interleukin (IL) -10. These results indicate the improvement of colon tissue as a result of reduced mucosal damage and colon epithelial permeability (Chibbar and Dieleman, 2015).

In the study on rats, it is stated that EcN reduces IBS. IBS is a functional bowel disease and is manifested by constipation or diarrhea due to the more or less normal colon movement. It was determined that colon movement improved by giving EcN orally to rats. It is thought that this may be due to acetic acid, the final product of carbohydrate metabolism (Altundaş et al., 2017).

The Nissle 1917 strain is also known to be effective in treating infection-related intestinal problems. It has been reported that the application of EcN to newborn babies prevents colonization of the intestine by microbial pathogens (Boudeau et al., 2003). Henker et al conducted a randomized study of 150 children suffering from diarrhea for 1-47 months of non-specific reasons. The recovery rates in EcN and placebo groups at the end of 7, 14 and 21 days were 78.7%, 93.3% and 98.7% in EcN, respectively, 59.2%, 65.8% and 71.1% in the placebo group. A significant difference was observed between these two groups and it was concluded that the use of EcN had significant effects in the treatment process (Henker et al., 2008).

*Lactobacillus spp*. and *Escherichia coli* Nissle 1917 are two commonly used probiotics in the treatment of various medical conditions such as rotavirus, diarrhea and inflammatory bowel disease in humans. In a study of a mouse model, the decrease of intestinal inflammation seen in the mouse receiving EcN supplementation Lactobacillus spp. higher than. This result shows that EcN is a more effective probiotic than *Lactobacillus spp.* (Kandasamy et al., 2017).

EcN use also has an impact on cancer-causing solid tumors. EcN strain is very successful in adhesion and colonization to the tumor. The specific colonization performed by bacteria to solid tumors leads to new approaches in both tumor diagnosis and treatment. Studies on EcN-mediated tumor therapies show that probiotic EcN can be designed to safely and selectively deliver therapeutic beneficial loads to the tumor microenvironment and can be used as an optimal tool for live cancer therapeutics (Stritzker et al., 2010).

In a study in mice, the effect of EcN intake on obesity and blood sugar levels in mice was investigated. It has been reported that EcN supplementation has a positive effect on body weight and blood sugar levels, however beneficial effects on hepatatic biochemistry and histological changes. EcN supplementation has been shown to cause significant changes in gene expression, which regulate food intake in the hypothalamus. This effect is thought to be related to the regulation of neuropeptide expression of energy intake and expenditure in the hypothalamus. This study shows a successful example of EcN use for weight management (Ma et al., 2020).

In a study conducted with mice in which the infection prevention effect of EcN was investigated, the mice were given oral EcN before the *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes* were infected and the results were examined. It has been determined that the intake of EcN causes a significant decrease in the number of microorganisms. This indicates that EcN has an anti-infection effect (Hockertz, 1997).

Studies with the EcN strain show that the use of the strain as a probiotic is effective against a wide range of diseases, from IBD to prevention of infestation and tumor development. While these data are promising, robust, randomized controlled trials are still needed to recommend the use of probiotics as part of the standard treatment regimen. It is thought that more effective treatments are possible with appropriate probiotics according to ongoing research and individualized management based on carefully selected individual microbiota composition and function (Chibbar and Dieleman, 2015).

## CONCLUSION

Probiotic microorganisms have gained an important place in the field of food and medicine in recent years in terms of using them in the treatment of various diseases and increasing the quality of life. These organisms offer several advantages in terms of ease of use, bio-reliability and accessibility. EcN is an important probiotic bacteria that has been used for over 100 years and has positive effects in the treatment of many diseases. Due to these features, it is the subject of many researches on its origin, microbiological aspect, mechanisms of action, biosafety, and use in medicine.

## REFERANCES

Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, Oelschlaeger TA 2004. The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 40(3), 223-229.

Altuntaş S, Korukluoğlu M, Altuntaş V 2017. Probiyotik Escherichia coli Suşu Nissle 1917. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 23(7), 933-940.

Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M 2013. Probiotics: properties, examples, and specific applications. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 3(3), a010074.

Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A 2003. Inhibitory effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent–invasive E. coli strains isolated from patients with Crohn's disease. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 18(1), 45-56.

Böhm SK, Kruis W 2006. Probiotics: do they help to control intestinal inflammation?. Annals of the New York Academy of Sciences, 1072(1), 339-350.

Bury S, Soundararajan M, Bharti R, von Bünau R., Förstner KU, Oelschlaeger TA 2018) The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 combats lambdoid bacteriophages stx and λ. Frontiers in Microbiology, 9, 929.

CDC, 2018. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Centers for Disease Control and Prevention. Avaliable at: https://www.cdc.gov/ibd/what-is-IBD.htm

Chibbar R, Dieleman LA 2015. Probiotics in the management of ulcerative colitis. Journal of Clinical Gastroenterology, 49, S50-S55.

Currò D, Ianiro G, Pecere S, Bibbò S, Cammarota G 2017. Probiotics, fibre and herbal medicinal products for functional and inflammatory bowel disorders. British Journal of Pharmacology, 174(11), 1426-1449.

Dunne KA, Chaudhuri RR, Rossiter AE, Beriotto I, Browning DF, Squire D, Henderson IR 2017. Sequencing a piece of history: complete genome sequence of the original Escherichia coli strain. Microbial Genomics, 3(3).

FAO, 2006. Probiotic in Food, *FAO Food and Nutrition Paper 85*. Available at: http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf

Faubion WA, Sandborn WJ 2000. Probiotic therapy with E. coli for ulcerative colitis: take the good with the bad. Gastroenterology, 118(3), 630-631.

Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U 2004. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. Journal of Bacteriology, 186(16), 5432-5441.

Hancock V, Dahl M, Klemm P 2010. Probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation. Journal of Medical Microbiology, 59(4), 392-399.

Henker J, Laass MW, Blokhin BM, Maydannik VG, Bolbot YK, Elze M, Schulze J 2008. Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 versus placebo for treating diarrhea of greater than 4 days duration in infants and toddlers. The Pediatric Infectious Disease Journal, 27(6), 494-499.

Hockertz S 1997. Augmentation of host defence against bacterial and fungal infections of mice pretreated with the non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917. Arzneimittel-Forschung, 47(6), 793-796.

Kandasamy S, Vlasova AN, Fischer DD, Chattha KS, Shao L, Kumar A, Saif LJ 2017. Unraveling the differences between gram-positive and gram-negative probiotics in modulating protective immunity to enteric infections. Frontiers in Immunology, 8, 334.

Koçak Y, Fındık A, Çiftçi A 2016. Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 27(2), 118-122.

Konturek PC, Sliwowski Z, Koziel J, Ptak-Belowska A, Burnat G, Brzozowski T, Konturek SJ 2009. Probiotic bacteria Escherichia coli strain Nissle 1917 attenuates acute gastric lesions induced by stress. J Physiol Pharmacol, 60(Suppl 6), 41-48.

Kruis W, Frič P, Pokrotnieks J, Lukáš M, Fixa B, Kaščák M, Wolff C 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut, 53(11), 1617-1623.

Ma J, Li C, Wang J, Gu J 2020. Genetically Engineered Escherichia coli Nissle 1917 Secreting GLP-1 Analog Exhibits Potential Antiobesity Effect in High-Fat Diet-Induced Obesity Mice. Obesity, 28(2), 315-322.

Malchow HA 1997. Crohn's disease and Escherichia coli: a new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?. Journal of Clinical Gastroenterology, 25(4), 653-658.

McFarland LV 2015. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. Clinical Infectious Diseases, 60(suppl_2), S85-S90.

McNabb B, Isakow W 2008. Probiotics for the prevention of nosocomial pneumonia: current evidence and opinions. Current Opinion in Pulmonary Medicine, 14(3), 168-175.

Schrezenmeir J, de Vrese M 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. The American Journal of Clinical Nutrition, 73(2), 361s-364s.

Schultz M 2008. Clinical use of E. coli Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases, 14(7), 1012-1018.

Scaldaferri F, Gerardi V, Mangiola F, Lopetuso LR, Pizzoferrato M, Petito V, Gasbarrini A 2016. Role and mechanisms of action of Escherichia coli Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update. World Journal of Gastroenterology, 22(24), 5505.

Sonnenborn U, Schulze J 2009. The non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917–features of a versatile probiotic. Microbial Ecology in Health and Disease, 21(3-4), 122-158.

Stritzker J, Hill PJ, Gentsche I, Szalay AA 2010. Myristoylation negative msbB-mutants of probiotic E. coli Nissle 1917 retain tumor specific colonization properties but show less side effects in immunocompetent mice. Bioengineered Bugs, 1(2), 139-145.

Sun J, Gunzer F, Westendorf AM, Buer J, Scharfe M, Jarek M, Zeng AP 2005. Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 inferred from raw genome data Journal of Biotechnology, 117(2), 147-161.

Xavier RJ, Podolsky DK 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature, 448(7152), 427-434.

Yu X, Lin C, Yu J, Qi Q, Wang Q 2019. Bioengineered Escherichia coli Nissle 1917 for tumour-targeting therapy. Microbial Biotechnology.

# Retrospective evaluation of routine biochemical blood parameters in children with cerebral palsi

Hale GÖK DAĞIDIR[1*], Neslihan ÇELİK BUKAN[2], Ebru ARHAN[3], Nezrin TOMBUL[4], Esra ÜLGEN TEMEL[5]

[1]Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey
[2]Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey
[3]Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Pediatric Neurology, Ankara, Turkey
[4]Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey
[5]Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Pediatric Neurology, Ankara, Turkey

*Corresponding author e-mail: hgokdagidir@gmail.com

**Abstract**
Cerebral palsy (Cp) is a persistent developmental disorder that is common in childhood and affects movement and posture throughout life. Along with motor dysfunction, which is the main finding of the disease; Sensory cognitive problems, epilepsy, communication perception problems, oral motor failure and related nutritional problems, behavioral disorders, orthopedic disorders, neurological dysfunctions, convulsions, chronic lung problems and sleep problems are common. The prevalence of Cp is approximately 2-3.5 per 1000 live births. In addition, this rate increases to 65 in 1000 live births in premature births below 1500 g. The aim of this retrospective study was to evaluate the biochemical blood parameters of children with Cp. The study included 50 children with Cp aged between 0 and 18 years and 50 healthy children as a control group. The Cp group was selected from the children with Cp diagnosis in the Department of Pediatric Neurology at Gazi University Faculty of Medicine between 2018-2019 and the control group was selected from the Children's Health Unit. Control group; was selected from patients who were in the same age range as the Cp group and who did not have any neurological disease. For the study, the ethics committee permission was obtained from the meeting on 28.05.2018 (decision number: 430) from Gazi University Clinical Research Ethics Committee. In two groups, routine biochemical parameters were evaluated retrospectively. According to our study; creatinine, calcium, phosphorus, sodium, folic acid, albumin ratios were significantly different between Cp and control group ($p<0,05$). As a result; in children with cerebral palsy there may be bone metabolism disorders. This quality of life in chronic monitoring of children so that these disorders can be corrected early it is important to be noticed and treated.
**Keywords:** Cerebral palsy, Biochemistry, Blood parameters

## INTRODUCTION

Cerebral palsy (Cp) ; It is a permanent motor dysfunction, posture and movement disorder that develops as a result of injury in the prenatal, natal and postnatal periods in the developing brain, which is not progressive but can change with age and restricts movement (Bax, Goldstein, Rosenbaum, Leviton, & Paneth, 2005).
Frequently, motor dysfunction, which is the main finding of the disease; sensory cognitive problems, epilepsy, communication perception problems, oral motor failure and related nutritional problems, behavioral disorders, orthopedic disorders, neurological dysfunctions, convulsions, chronic lung problems, and sleep problems are common. The fact that different systems are affected at the same time requires multi-disciplinary impression of children with cerebral palsy. In individuals with cerebral palsy, the clinical picture may change over time, eg spasticity or involuntary movements may replace the initial hypotonia (Sankar & Mundkur, 2005).
Children with Cp with moderate to severe functional can be vulnerable to low bone mineral density (BMD) due to reduced mobility, decreased growth rate, in adequate nutrition, low vitamin D levels, and irregularities in pubertal and skeletal maturation (Henderson, Kairalla, Abbas, & Stevenson, 2004; Hough, Boyd, & Keating, 2010; Tosun et al., 2017).
Cerebral palsy registries from developed countries suggest its prevalence is 2–3 per 1000 live births. The prevalence is significantly higher in children born prematurely: 40–100 per 1000 live births for those born below 28 weeks gestation. (Wimalasundera & Stevenson, 2016), (Surveillance of Cerebral Palsy in, 2000).

Children with Cp are smaller than healthy children with peers and have a certain body composition. Decrease in bone mineral density , muscle mass, fat mass; are the features that distinguish them from healthy children. Malnutrition is common in children with Cp due to nutritional barriers such as chewing, sucking, swallowing, gastroesophageal reflux disease, constipation, or changes in appetite caused by anticonvulsant medications that prevent the development of seizures used in the treatment of many types of epilepsyThe etiology of Cp is

diverse and multifactorial. It is usually caused by injury to the brain before or at birth. This is the major causative factor. It can also happen between the ages of 3–5 y. There are three predominant Cp syndromes (spastic, dyskinetic and ataxic). Hypotonic Cp, though described earlier, is absent from the contemporary classifications. Majority of patients with "hypotonic Cp" in early infancy later develop spastic, dyskinetic or ataxic Cp. However, some children may continue to be hypotonic due to involvement of cerebro-cerebellar circuits or the extrapyramidal circuity (Gulati & Sondhi, 2018).

Diagnosis of cerebral palsy requires a complete history, physical examination, and ancillary investigations. The history should include a detailed account of gestation and perinatal events and documentation of the attainment of developmental milestones. In addition to a general physical inspection, the examination should assess station (pelvic and leg alignment during stance), spinal alignment, gait (if applicable), active and passive range of motion of joints, sensibility, motor power, muscle tone (spasticity), type and extent of movement disorders, and presence of limb deformity. Cranial ultrasonography, MRI, CT, and other specialised tests are used to assess the extent of the CNS insult (Koman, Smith, & Shilt, 2004).

The aim of this retrospective study was to evaluate the biochemical blood parameters of children with Cp.

## MATERIALS AND METHODS

The study included 50 children with Cp aged between 0 and 18 years and 50 healthy children as a control group. 32 of the children with Cp were boys and 18 were girls. The control group children were 29 boys and 21 girls. The Cp group was selected from the children with Cp diagnosis in the Department of Pediatric Neurology at Gazi University Faculty of Medicine between 2018-2019 and the control group was selected from the Children's Health Unit. Control group; was selected from patients who were in the same age range as the Cp group and who did not have any neurological disease. For the study, the ethics committee permission was obtained from the meeting on 28.05.2018 (decision number: 430) from Gazi University Clinical Research Ethics Committee. In two groups, routine biochemical parameters were evaluated retrospectively. Children with Cp and control groups participated in the study; BUN, creatinine, calcium, phosphorus, ALP, sodium, potassium, iron, ferritin, TSH, T4, D, AST, ALT, folic acid, cholesterol, triglyceride, chlorine, B12, albumin values were analyzed retrospectively.

Ferritin, TSH, T4 Vitamin D, B12 tests were run on Beckman Coulter DXI 800 autoanalyser. All of these tests use the paramagnetic particle chemiluminescence immunoassay method for the quantitative determination of these tests in human serum.

Glucose Hexokinase, Urea: Urease; Creatinine: Jaffe,; Calcium: Arsenazo III; AST, ALT, GGT: Enzymatic; Sodium, Potassium, Chlorine: Indirect ISE (Ion Selective Electrote), Total Cholesterol: The spectrophotometric measurement of the absorbance of the chromophore formed after enzymatic destruction of cholesterol esters with Cholesterol Esterase; Trigiliserid: It is based on the spectrophotometric measurement of the absorbance of the chromophore formed by a series of enzymatic reactions with the enzymatic destruction of triglyceride with Lipase. All these above measurements were carried out on Beckmac Coulter AU 5800 autoanalysers.

Data were analyzed using SPSS 25.0 statistical package program. Descriptive statistics (frequency, percentage distribution, mean, median etc.) were used for statistical analysis. Subgroups were formed according to different characteristics and it was examined whether the quantitative variables fit the normal distribution. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

## RESULTS

Fifty (50) children with Cp and 50 healthy controls aged between 0 and 18 years were included in the study. 32 of the children with Cp were boys and 18 were girls. The control group children were 29 boys and 21 girls.

Children with Cp and control groups participated in the study; BUN, creatinine, calcium, phosphorus, ALP, sodium, potassium, iron, ferritin, TSH, T4, D, AST, ALT, folic acid, cholesterol, triglyceride, chlorine, B12, albumin values were analyzed retrospectively.

In our study the difference between calcium levels of Cp and control group was statistically significant p = 0,031 (p<0,05). The average calcium levels of children diagnosed with Cp was Mean=9.9112 (mg/dl) , while the average calcium levels of the control group were Mean=10.2245 (mg/dl). The difference between phosphorus levels of Cp and control group was statistically significant (p<0,05). The average levels of phosphorus children diagnosed with Cp was Mean=4.5174 (mg/dl) , while the average phosphorus levels of the control group were Mean=5.3086 (mg/dl).

The difference between folic acid levels of Cp and control group was statistically significant p = 0,018 (p<0,05). The average folic acid levels of children diagnosed with Cp was Mean=16.7033 (ng/ml) , while the average folic acid levels of the control group were Mean=9.5714 (ng/ml).

In our study the difference between albumin levels of Cp and control group was statistically significant p = 0,038 (p<0,05). The average albumin levels of children diagnosed with Cp was Mean=4.5715 (gr/dl) , while the average albumin levels of the control group were Mean=4.1504(gr/dl).

**Table 1** Comparison of study and control groups in terms of biochemistry laboratory examination results

| | Cp Group N=50 | Control Group N=50 | P Value |
|---|---|---|---|
| | Mean± SD | Mean± SD | |
| Albumin g/dl | 4.1504±0.54094 | 4.5715±0.80989 | 0.038* |
| Creatinine mg/dl | 0.3022±0.09242 | 0.4028±0.19959 | 0.030* |
| D µg/L | 27.4553±9.46148 | 25.1285±8.28166 | 0.335 |
| T4 ng/dl | 0.9521±0.19995 | 0.9572±0.16822 | 0.912 |
| Calcium mg/dl | 9.9112±0.68038 | 10.2245±0.47606 | 0.031* |
| AST U/L | 27.2542±10.47660 | 31.4545±15.26817 | 0.504 |
| Sodium mmol/L | 140.1079±3.41851 | 138.7188±1.87056 | 0.039* |
| Potassium mmol/L | 4.4722±0.68304 | 4.4594±0.40667 | 0.926 |

Notes: Student t-test was used for parametric data and Mann–Whitney U test was used to compare the non-parametric data. N (Number of people)=50 Cp group, N (Number of people)=50 control group. D=Vitamin D, T4=Thyroxine, AST=Aspartate Aminotransferase.

According to our study; creatinine, calcium, phosphorus, sodium, folic acid, albumin ratios were significantly different between Cp and control group (p<0,05).

## DISCUSSION

In children with Cp, undernutrition contributes to poor somatic growth, diminished bone mineral density, abnormal pubertal development, and poor general health (Henderson et al., 2002a), (Worley et al., 2002), (Liptak et al., 2001).

According to the study conducted by Taşdemir et al.; this study was performed in 24 children (16 boys, eight girls) aged from 10 months to 12 years (mean (±SD) age 4.1±2.9 years) with Cp who were admitted to the Department of Pediatrics in the Faculty of Medicine of Atatürk University. Nineteen age- and sex-matched children without any disease affecting bone turnover were considered as the control group. Differences in serum 25OHD3, PTH and ALP concentrations between the patient and control groups were not statistically

significant (P>0.05). However, Ca (calcium) and P (phosphorus) levels of children with Cp were significantly higher than those of controls (P<0.05) (Tasdemir et al., 2001).

In our study the difference between calcium levels of Cp and control group was statistically significant p = 0,031 (p<0,05). The average calcium levels of children diagnosed with Cp was Mean=9.9112 (mg/dl) , while the average calcium levels of the control group were Mean=10.2245 (mg/dl). The difference between phosphorus levels of Cp and control group was statistically significant (p<0,05). The average levels of phosphorus children diagnosed with Cp was Mean=4.5174 (mg/dl) , while the average phosphorus levels of the control group were Mean=5.3086 (mg/dl).

According to the study conducted by Papadopoulos et al.; studied 108 patients (55 males, 53 females) ranging between 8 and 29 years that were hosted in a specialized institute in Thessaloniki, Greece, due to cerebral palsy. In most cases, cerebral palsy resulted from perinatal hypoxemia; other causes included craniocerebral traumas, infections of the central nervous system and hereditary disorders. Approximately 33% of patients suffered from hypochromic anemia, whereas 38% were iron deficient. Folic acid and B12 levels were within normal range in all cases (Papadopoulos et al., 2008).

In our study the difference between folic acid levels of Cp and control group was statistically significant p = 0,018 (p<0,05). The average folic acid levels of children diagnosed with Cp was Mean=16.7033 (ng/ml) , while the average folic acid levels of the control group were Mean=9.5714 (ng/ml).

69 Cp patients with ages between 2 and 21 years old were included in the study conducted by Roy et al. According to this research; Albuminaemia was normal in all patients. Mean 25(OH)D level was 24.3 ± 8.8 ng/mL; 33 patients (47.8%) had insufficiency and 21 (30.4%) deficiency; 36 patients (52.2%) had low ferritin levels (Le Roy et al., 2018) ((Henderson et al., 2002b; Lark et al., 2005).

In our study the difference between albumin levels of Cp and control group was statistically significant p = 0,038 (p<0,05). The average albumin levels of children diagnosed with Cp was Mean=4.5715 (gr/dl) , while the average albumin levels of the control group were Mean=4.1504(gr/dl). In our study, there was no significant difference in vitamin D levels between the two groups. The average vitamin D levels of children diagnosed with Cp was Mean= 27.4553(µg/L) , and the average vitamin D levels of the control group were Mean=25.1285(µg/L).

According to the study by Vrhovsek et al.;The aim of this study was to determine the effect of vitamin D and calcium substitution on bone mineral density (BMD) in a group of children with Cp in full-time care. Twenty children with the most severe form of Cp (spastic quadriplegia) who had been treated with anti epileptic drugs for a relatively long period of time were included in the study. Thirteen patients were treated for 9 months with 1,25-dihydroxy-cholecalciferol vitamin D (0.25 mcg daily) and with calcium (500 mg daily). Seven control children were used for observation only. BMD greatly increased in the treated group, while children with Cp in full-time care who did not receive vitamin D and calcium substitution continued to lose their bone mass. It can be concluded that the addition of vitamin D and calcium increases BMD in children with the most severe form of Cp, who are receiving anti epileptic drugs (Jekovec-Vrhovsek, Kocijancic, & Prezelj, 2000).

Eventually, according to our study; creatinine, calcium, phosphorus, sodium, folic acid, albumin ratios were significantly different between Cp and control group (p<0,05). In order to interpret the results of the study more accurately, groups should be investigated in various factors such as drug use status, whether they are receiving intravenous therapy or not. Relationships between calcium phosphorus and vitamin D levels should be investigated in more detail. Since our research is a retrospective study, there are limitations at these points.

## CONCLUSİONS

As a result; in children with cerebral palsy there may be bone metabolism disorders. This quality of life in chronic monitoring of children so that these disorders can be corrected early it is important to be noticed and treated.

We think that further studies should be conducted with larger patient groups on the bone metabolism, nutritional status, effects of vitamin supplementation to the process.

**REFERENCES**

Bax, M., Goldstein, M., Rosenbaum, P., Leviton, A., & Paneth, N. (2005). Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005 - Introduction. *Developmental Medicine and Child Neurology, 47*(8), 571-576. doi:10.1017/S001216220500112x

Gulati, S., & Sondhi, V. (2018). Cerebral Palsy: An Overview. *Indian J Pediatr, 85*(11), 1006-1016. doi:10.1007/s12098-017-2475-1

Henderson, R. C., Kairalla, J., Abbas, A., & Stevenson, R. D. (2004). Predicting low bone density in children and young adults with quadriplegic cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol, 46*(6), 416-419. doi:10.1017/s0012162204000672

DOI 10.1542/peds.110.1.e5

Henderson, R. C., Lark, R. K., Gurka, M. J., Worley, G., Fung, E. B., Conaway, M., . . . Stevenson, R. D. (2002b). Bone density and metabolism in children and adolescents with moderate to severe cerebral palsy. *Pediatrics, 110*(1 Pt 1), e5. doi:10.1542/peds.110.1.e5

Hough, J. P., Boyd, R. N., & Keating, J. L. (2010). Systematic review of interventions for low bone mineral density in children with cerebral palsy. *Pediatrics, 125*(3), e670-678. doi:10.1542/peds.2009-0292

Jekovec-Vrhovsek, M., Kocijancic, A., & Prezelj, J. (2000). Effect of vitamin D and calcium on bone mineral density in children with CP and epilepsy in full-time care. *Dev Med Child Neurol, 42*(6), 403-405. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10875526

Koman, L. A., Smith, B. P., & Shilt, J. S. (2004). Cerebral palsy. *Lancet, 363*(9421), 1619-1631. doi:10.1016/S0140-6736(04)16207-7

Lark, R. K., Williams, C. L., Stadler, D., Simpson, S. L., Henderson, R. C., Samson-Fang, L., & Worley, G. (2005). Serum prealbumin and albumin concentrations do not reflect nutritional state in children with cerebral palsy. *J Pediatr, 147*(5), 695-697. doi:10.1016/j.jpeds.2005.05.029

Le Roy, C., Barja, S., Sepulveda, C., Guzman, M. L., Olivarez, M., Figueroa, M. J., & Alvarez, M. (2018). Vitamin D and iron deficiencies in children and adolescents with cerebral palsy. *Neurologia*. doi:10.1016/j.nrl.2017.11.005

Liptak, G. S., O'Donnell, M., Conaway, M., Chumlea, W. C., Worley, G., Henderson, R. C., . . . Stevenson, R. D. (2001). Health status of children with moderate to severe cerebral palsy. *Developmental Medicine and Child Neurology, 43*(6), 364-370. doi:Doi 10.1017/S001216220100069x

Papadopoulos, A., Ntaios, G., Kaiafa, G., Girtovitis, F., Saouli, Z., Kontoninas, Z., . . . Hatzitolios, A. (2008). Increased incidence of iron deficiency anemia secondary to inadequate iron intake in institutionalized, young patients with cerebral palsy. *Int J Hematol, 88*(5), 495-497. doi:10.1007/s12185-008-0191-3

Sankar, C., & Mundkur, N. (2005). Cerebral palsy-definition, classification, etiology and early diagnosis. *Indian J Pediatr, 72*(10), 865-868. doi:10.1007/bf02731117

Surveillance of Cerebral Palsy in, E. (2000). Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE). *Dev Med Child Neurol, 42*(12), 816-824. doi:10.1017/s0012162200001511

Tasdemir, H. A., Buyukavci, M., Akcay, F., Polat, P., Yildiran, A., & Karakelleoglu, C. (2001). Bone mineral density in children with cerebral palsy. *Pediatrics International, 43*(2), 157-160. doi:DOI 10.1046/j.1442-200x.2001.01352.x

Tosun, A., Erisen Karaca, S., Unuvar, T., Yurekli, Y., Yenisey, C., & Omurlu, I. K. (2017). Bone mineral density and vitamin D status in children with epilepsy, cerebral palsy, and cerebral palsy with epilepsy. *Childs Nerv Syst, 33*(1), 153-158. doi:10.1007/s00381-016-3258-0

Wimalasundera, N., & Stevenson, V. L. (2016). Cerebral palsy. *Pract Neurol, 16*(3), 184-194. doi:10.1136/practneurol-2015-001184

Worley, G., Houlihan, C. M., Herman-Giddens, M. E., O'Donnell, M. E., Conaway, M., Stallings, V. A., . . . Stevenson, R. D. (2002). Secondary sexual characteristics in children with cerebral palsy and moderate to severe motor impairment: A cross-sectional survey. *Pediatrics, 110*(5), 897-902. doi:DOI 10.1542/peds.110.5.897

# Retrospective evaluation of routine hematology blood parameters in children with autism

Hale GÖK DAĞIDIR[1*], Neslihan ÇELİK BUKAN[2], Ebru ARHAN[3], Nezrin TOMBUL[4], Esra ÜLGEN TEMEL[5]

[1]Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey
[2]Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey
[3]Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Pediatric Neurology, Ankara, Turkey
[4]Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey
[5]Gazi University, Faculty of Medicine, Department of Pediatric Neurology, Ankara, Turkey

*Corresponding author e-mail: hgokdagidir@gmail.com

**Abstract**
Autism spectrum disorder is defined as a set of neurodevelopmental disorder, characterized by repetitive behaviors, restricted interests, social deficits and communication difficulties. Although the number of cases of ASD diagnosed over the last four decades has increased significantly, there is still considerable debate about the underlying pathophysiology of ASD. It is now seen that it affects 1.5% of the world's population and disproportionately affects men. The aim of this retrospective study was to evaluate the hematology blood parameters of children with autism. The study included 30 children with autism aged between 10 and 18 years and 30 healthy children as a control group. The autism group was selected from the children with autism diagnosis in the Department of Pediatric Neurology at Gazi University Faculty of Medicine between 2018-2019 and the control group was selected from the Children's Health Unit. For the study, the ethics committee permission was obtained from the meeting on 28.05.2018 (decision number: 430) from Gazi University Clinical Research Ethics Committee. In two groups, routine hematology parameters were evaluated retrospectively. According to our study; mean erythrocyte volume (MCV), neutrophil count, neutrophil percentage, lymphocyte percentage, are significantly different between autism and control group ($p<0,05$). The high neutrophil lymphocyte ratio supports the hypothesis that there is a role of neuroinflammation in the etiology of autism. The view that elevated levels of neutrophil lymphocytes may be a guide in screening and early intervention in autism may be the subject of new research.
**Keywords:** Autism, Blood parameters, Biochemistry, Neuroinflammation

## INTRODUCTION

Autism is a set of mixed neurodevelopmental conditions, characterised by early-onset hardship in social communication and extraordinarily restricted, repetitive behaviour and interests. Autism affects more boys than girls individuals (Lai, Lombardo, & Baron-Cohen, 2014) .The estimated global prevalence of autism spectrum disorder (ASD) is nearly 1.0% (Tseng et al., 2018), (Harrington & Allen, 2014)

Individuals with Autism Spectrum Disorder (ASD) vary in language ability, ranging from absent speech to fluent language, and in cognitive development, ranging from severe intellectual disability to above-average intellectual functioning. Individuals may also show associated medical comorbidities including epilepsy and minor physical anomalies, as well as psychiatric comorbidities, thus showing a wide clinical heterogeneity. The clinical heterogeneity of autism has long been a hindrance to understanding the pathophysiological mechanisms related. The reasons for autism are uncertain, but various theories of genetics, immunity, biological, and psychosocial factors have been proffered. (Chaste & Leboyer, 2012), (Bahmani, Sarrafchi, Shirzad, & Rafieian-Kopaei, 2016), (Brody, 2012).

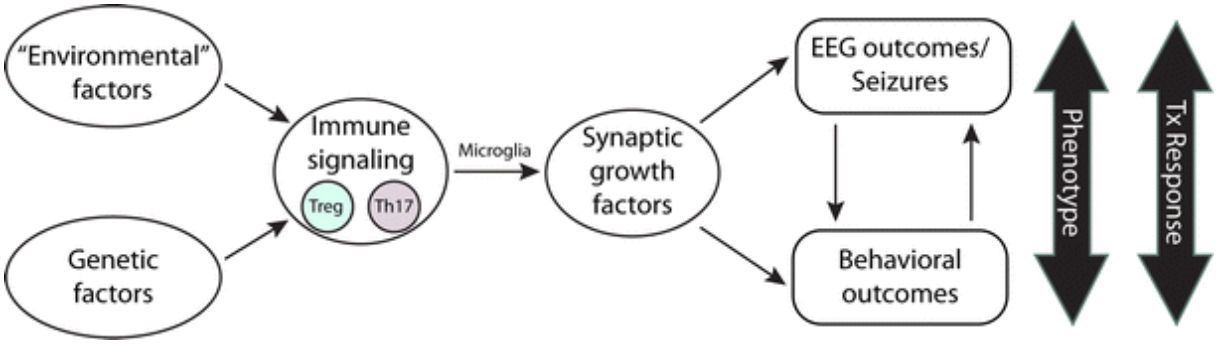
In the emergence of the disease; neurological factors, metabolic factors, gastrointestinal factors, prenatal-postnatal factors, psychosocial factors, genetic predisposition, environmental and immunological factors and ınteractions between these factors are shown (Howsmon, Kruger, Melnyk, James, & Hahn, 2017), (Lintas & Persico, 2009), (Gevi, Zolla, Gabriele, & Persico, 2016).

It is emphasized that gene-gene and gene-environment interactions are effective in the emergence of the disease. Genetics plays an important role in the etiology of autistic disorders. Increased risk was also identified

among monozygotic twins and siblings of children with autism. In addition, autistic symptoms; Regression syndrome has been associated with many genetic diseases such as fragile X, phenylketonuria. Due to environmental rooted FOCM / TS (Folate-dependent single carbon metabolism / transsulfuration) dysfunction, mother /father age, the lack of folate supplementation as well as exposure to toxic chemicals such as prenatal heavy metals, ethyl alcohol, pesticides, phthalates, polychlorinated biphenyls and traffic-related air pollution relieved basic neurodevelopmental processes, maternal rubella infection, valproate use in pregnancy is associated with ASD rates. These toxins create oxidative stress and affect heavy metal transsulfiration, glutathione, and intracellular processing of methylcobalamin (Chaste & Leboyer, 2012),(Howsmon, Kruger, Melnyk, James, & Hahn, 2017). In addition, the biochemical basis suggests that several brain neurotransmitters, e.g., dopamine (DA), serotonin (5-HT), gamma-amino butyric acid (GABA), acetylcholine (ACh), glutamate (Glu) and histamine (HA) participate in the onset and progression of ASD (Eissa et al., 2018).

Vitamin D deficiency was therefore assessed as a risk factor for autism. Vitamin D is a neuroactive steroid affecting brain development and function. It plays an important role in myelination, which is important for connectivity in the brain. D assist several health benefits including neuroprotective effects, especially by antioxidant activity, neuronal calcium regulation, neurotransmitter regulation, influence on several neurotrophic factors and immunomodulation (Macova, Bicikova, Ostatnikova, Hill, & Starka, 2017), (Fernell et al., 2015). Several risk factors found for autism have very straightforward connections to inflammation. The recent rise in autism could be attributable, at least in part, to this rise in inflammation. Aside from inflammation, oxidative stress is the second category in the landscape of autism-associated factors (Parker et al., 2017).

Figure 1: Neuroimmunologic and Neurotrophic Interactions in Autism Spectrum Disorders: Relationship to Neuroinflammation; Environmental and genetic influences of ASD phenotypes and treatment responses. Environmental and genetic factors may cause immune dysregulation via altered T cell subtype production (Th1/Th2/Th17/Treg), thereby influencing microglial functioning. The impact of altered microglial cell physiology leads to dysregulation of synaptic growth factors and signaling pathways (BDNF/WNT, FGF and their intracellular components–PI3K/Akt/mTOR signaling) which contributes to ASD phenotypes and treatment responses. Tx = treatment (Ohja et al., 2018).




## MATERIALS AND METHODS

The study included 30 children with autism aged between 10 and 18 years and 30 healthy children as a control group. The autism group was selected from the children with autism diagnosis in the Department of Pediatric Neurology at Gazi University Faculty of Medicine between 2018-2019 and the control group was selected from the Children's Health Unit. In two groups, routine hematology blood parameters were evaluated retrospectively. Children with autism and control groups participated in the study; RBC (erythrocyte) , HGB (hemoglobin), HCT (hematocrit), MCV (mean erythrocyte volüme), MCH (mean cell hemoglobin), MCHC (mean cell hemoglobin concentration), RDW (erythrocyte range width), RDWSD, PLT (platelets), MPV (mean platelet volüme), PCT (platekrit) , PDW (platelet range width,) NRBC, WBC (leukocyte) , Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, IG (ımmature granulosıde) values were analyzed retrospectively. All these measurements were carried out on the Sysmex XN 1000 series (1000-2000-3000) analyzer.Working principles of hematology analyzers; electrical impedance, light scattering, radiofrequency

conductivity, cytochemistry. Some of the blood collected is broken down and Hgb and WBC are counted, and the other part of the blood is diluted without being broken down and erythrocyte and platelet counts are performed.

Patients were also examined in terms of iron, ferritin, iron binding capacity, but these values were not evaluated in every patient ( Beckman Coulter DXI800 autoanalizer).

Data were analyzed using SPSS 25.0 statistical package program. Descriptive statistics (frequency, percentage distribution, mean, median etc.) were used for statistical analysis. Subgroups were formed according to different characteristics and it was examined whether the quantitative variables fit the normal distribution. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

**RESULTS**

Thirty (30) children with autism and 30 healthy controls aged between 10 and 18 years were included in the study. 18 of the children with autism were boys and 12 were girls. The control group children were 14 boys and 16 girls.

Children with autism and control groups participated in the study; RBC (erythrocyte) , HGB (hemoglobin), HCT (hematocrit), MCV (mean erythrocyte volüme), MCH (mean cell hemoglobin), MCHC (mean cell hemoglobin concentration), RDW (erythrocyte range width), RDWSD, PLT (platelets), MPV (mean platelet volüme), PCT (platekrit) , PDW (platelet range width,) NRBC, WBC (leukocyte) , Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, IG (ımmature granulosıde) values were analyzed retrospectively.

In our study, the mean erythrocyte volume (MCV) of both autism and control groups was within the reference value range (76.9-90.6), but the difference between the mean values of the two groups was found statistically significant ($p < 0.05$ ). MCV average of autism group was found higher than control group. The average MCV levels of children diagnosed with autism was M=82.92, while the average MCV levels of the control group were M=79.32.

When autism and control group are examined in terms of neutrophil count; The mean neutrophil count in the autism group was higher than the control group and it was statistically significant ($p = 0.015$).The average Neutrophil count levels of children diagnosed with autism was Mean(M)=4.32, while the average Neutrophil count levels of the control group were M=3.27, the Neutrophil count of both autism and control groups was within the reference value range (1.82-7.47).

When autism and the control group were examined in terms of neutrophil percentage; Although the average of both groups was within the reference range (39-73.6), the percentage of neutrophils in the Autism group was higher than the control group and was statistically significant ($p = 0.07$). The average Neutrophil percentage levels of children diagnosed with autism was M=52.09, while the average Neutrophil percentage levels of the control group were M=43.45.

When autism and control group were examined in terms of lymphocyte percentage; Although the mean of both groups was within the reference range (18.2-49.8), the mean lymphocyte percentage in the Autism group was lower than the control group and was statistically significant ($p = 0.07$). The average lymphocyte percentage levels of children diagnosed with autism was M=36.84, while the average lymphocyte percentage levels of the control group were M=45.73.

Patients were also examined in terms of iron, ferritin, iron binding capacity, but these values were not evaluated in every patient. When the groups are evaluated in terms of iron; Autism group N = 9, M = 78.2, control group N = 4, M = 53.25, reference range (50-120). When the groups are evaluated in terms of ferritin; Autism group N: 14, M = 34, control group N = 21, M = 30.14, reference range (10.4-58.2). When the groups are evaluated in terms of iron binding capacity; Autism group N = 9, M = 332.32, control group N = 4, M = 354.42 were found, reference values (155-355).

## DISCUSSION

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder where immune cells play an important role. Oxidants and pro-inflammatory cytokines generated by innate immune cells have been implicated in the pathogenesis of ASD. Many previous reports have shown the role of various enzymatic antioxidants in the plasma/red blood cells of ASD subjects, however no study so far has evaluated them in peripheral immune cells of innate origin (neutrophils and monocytes) in ASD patients (Nadeem et al., 2019).

Both genetic and environmental factors are thought to contribute to the pathogenesis of ASD and maternal inflammation during pregnancy, particularly as a consequence of infection, is being increasingly recognized as a potential risk factor for the development of ASD (Osokine & Erlebacher, 2017), (Newschaffer et al., 2007).

Out of many factors involved in the pathogenesis of ASD, oxidative stress has emerged as a strong contender (Rossignol & Frye, 2012), (Frustaci et al., 2012), (Nadeem et al., 2019) . Oxidative stress usually results from excessive generation of reactive oxygen species (ROS) which arise from different cellular sources either spontaneously or enzymatically (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012). Innate immune cells such as neutrophils and monocytes are equipped with antioxidants to detoxify the ROS produced during normal cellular metabolism (Nadeem et al., 2019). Free oxygen radicals as known reactive oxygen species (ROS) are reactive chemical species with an unpaired electron that are produced through a variety of physiologic and pathologic processes. Free radicals have been implicated in a variety of neuropsychiatric conditions, many of which are marked by the gradual development of psychopathologic symptoms and movement disorder (Zoroglu et al., 2004).

In the study conducted by Hesapçıoğlu et al; The level and proportions of peripheral blood mononuclear cells, which may indicate the immunological mechanisms involved in the etiopathogenesis of ASD, were investigated. Complete blood count parameters of 45 ASD cases were compared with healthy controls. The lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) was lower than the controls. LMR and neutrophil-to-lymphocyte ratio were found to be predictors of ASD (Tural Hesapcioglu, Kasak, Kurt, & Ceylan, 2019). In our study, when the ratio of lymphocyte count to monocyte count was calculated from the mean values, it was calculated as 4.675 (mean lymphocyte count = 3.05, mean monocyte count = 0.6524) in the autism group and 5.994 (mean lymphocyte count = 3.4287, mean monocyte count = 0.5720) in the control group. The rate of lymphocyte to monocyte was low in the autism group.

To the research conducted by Kulaksızoğlu et al. ; 67 children with autism and 67 control groups were included. In the ASD group, the neutrophil/ lymphocyte ratio (NLR) was significantly higher than in the control group ($p<0.001$). To the research conducted by Kutlu et al; 64 children with autism aged 2-5 years and 64 control groups were included. NLRs were significantly higher in ASD. Children with ASD had significantly higher neutrophil counts but lower platelet and lymphocyte counts compared to those of healthy controls (Kutlu & Cevher Binici, 2018).

In our study; the percentage of neutrophils in the Autism group was higher than the control group and was statistically significant and the mean lymphocyte percentage in the Autism group was lower than the control group and was statistically significant. According to our research, the ratio of neutrophil percentage to lymphocyte percentage; 1.41 in the autism group and 0.95 in the control group. The neutrophil lymphocyte ratio in the autism group is higher than the control group and is compatible with the literature.

## CONCLUSIONS

As a result; We think that further studies should be conducted with larger patient groups on the role of neuroinflammation in autism, immune system, lymphocyte monocyte ratio, neutrophil lymphocyte ratio, and biomarker.

**REFERENCES**

Bahmani, M., Sarrafchi, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2016). Autism: Pathophysiology and Promising Herbal Remedies. *Curr Pharm Des, 22*(3), 277-285. doi:10.2174/1381612822666151112151529

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J, 5*(1), 9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613

Brody, H. (2012). Autism. *Nature, 491*(7422), S1. doi:10.1038/491s1a

Chaste, P., & Leboyer, M. (2012). Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues Clin Neurosci, 14*(3), 281-292. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226953

Eissa, N., Al-Houqani, M., Sadeq, A., Ojha, S. K., Sasse, A., & Sadek, B. (2018). Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Front Neurosci, 12*, 304. doi:10.3389/fnins.2018.00304

Fernell, E., Bejerot, S., Westerlund, J., Miniscalco, C., Simila, H., Eyles, D., . . . Humble, M. B. (2015). Autism spectrum disorder and low vitamin D at birth: a sibling control study. *Mol Autism, 6*, 3. doi:10.1186/2040-2392-6-3

Frustaci, A., Neri, M., Cesario, A., Adams, J. B., Domenici, E., Dalla Bernardina, B., & Bonassi, S. (2012). Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med, 52*(10), 2128-2141. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.011

Gevi, F., Zolla, L., Gabriele, S., & Persico, A. M. (2016). Urinary metabolomics of young Italian autistic children supports abnormal tryptophan and purine metabolism. *Mol Autism, 7*, 47. doi:10.1186/s13229-016-0109-5

Harrington, J. W., & Allen, K. (2014). The clinician's guide to autism. *Pediatr Rev, 35*(2), 62-78; quiz 78. doi:10.1542/pir.35-2-62

Howsmon, D. P., Kruger, U., Melnyk, S., James, S. J., & Hahn, J. (2017). Classification and adaptive behavior prediction of children with autism spectrum disorder based upon multivariate data analysis of markers of oxidative stress and DNA methylation. *PLoS Comput Biol, 13*(3), e1005385. doi:10.1371/journal.pcbi.1005385

Kutlu, A., & Cevher Binici, N. (2018). Does increased neutrophil-lymphocyte ratio predict autism spectrum disorder? *Anadolu Psikiyatri Dergisi-Anatolian Journal of Psychiatry, 19*(6), 607-614. doi:10.5455/apd.296339

Lai, M. C., Lombardo, M. V., & Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *Lancet, 383*(9920), 896-910. doi:10.1016/S0140-6736(13)61539-1

Lintas, C., & Persico, A. M. (2009). Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet, 46*(1), 1-8. doi:10.1136/jmg.2008.060871

Macova, L., Bicikova, M., Ostatnikova, D., Hill, M., & Starka, L. (2017). Vitamin D, neurosteroids and autism. *Physiol Res, 66*(Suppl 3), S333-S340. doi:10.33549/physiolres.933721

Nadeem, A., Ahmad, S. F., Attia, S. M., Al-Ayadhi, L. Y., Al-Harbi, N. O., & Bakheet, S. A. (2019). Dysregulated enzymatic antioxidant network in peripheral neutrophils and monocytes in children with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 88*, 352-359. doi:10.1016/j.pnpbp.2018.08.020

Newschaffer, C. J., Croen, L. A., Daniels, J., Giarelli, E., Grether, J. K., Levy, S. E., . . . Windham, G. C. (2007). The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health, 28*, 235-258. doi:10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144007

Ohja, K., Gozal, E., Fahnestock, M., Cai, L., Cai, J., Freedman, J. H., . . . Barnes, G. N. (2018). Neuroimmunologic and Neurotrophic Interactions in Autism Spectrum Disorders: Relationship to Neuroinflammation. *Neuromolecular Med, 20*(2), 161-173. doi:10.1007/s12017-018-8488-8

Osokine, I., & Erlebacher, A. (2017). Inflammation and Autism: From Maternal Gut to Fetal Brain. *Trends Mol Med, 23*(12), 1070-1071. doi:10.1016/j.molmed.2017.10.008

Parker, W., Hornik, C. D., Bilbo, S., Holzknecht, Z. E., Gentry, L., Rao, R., . . . Nevison, C. D. (2017). The role of oxidative stress, inflammation and acetaminophen exposure from birth to early childhood in the induction of autism. *J Int Med Res, 45*(2), 407-438. doi:10.1177/0300060517693423

Rossignol, D. A., & Frye, R. E. (2012). A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. *Mol Psychiatry, 17*(4), 389-401. doi:10.1038/mp.2011.165

Tseng, P. T., Cheng, Y. S., Chen, Y. W., Stubbs, B., Whiteley, P., Carvalho, A. F., . . . Lin, P. Y. (2018). Peripheral iron levels in children with autism spectrum disorders vs controls: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Res, 50*, 44-52. doi:10.1016/j.nutres.2017.11.004

Tural Hesapcioglu, S., Kasak, M., Kurt, A. N. C., & Ceylan, M. F. (2019). High monocyte level and low lymphocyte to monocyte ratio in autism spectrum disorders. *International Journal of Developmental Disabilities, 65*(2), 73-81. doi:10.1080/20473869.2017.1371369

Zoroglu, S. S., Armutcu, F., Ozen, S., Gurel, A., Sivasli, E., Yetkin, O., & Meram, I. (2004). Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 254*(3), 143-147. doi:10.1007/s00406-004-0456-7

# Vitamin C prevents arsenic-induced oxidative and DNA damage in TM3 cell line

Banu ORTA-YILMAZ[1]*

[1]Istanbul University, Faculty of Science, Department of Biology, Istanbul, Turkey

* Corresponding author e-mail: banu.yilmaz@istanbul.edu.tr

## Abstract

Arsenic and arsenic compounds are ubiquitous in nature and exhibit both metal and non-metal properties. The most common inorganic arsenic compound is sodium arsenite (As) which is highly soluble in water. For the general population, the main source of arsenic exposure is drinking water. Since As is found in groundwater and used as an insecticide, it reaches people by contaminated drinking water and nutrients. Arsenic accumulation causes hematological, hepatic, renal and neurological diseases. It is known that arsenic has negative effects on the male reproductive system. However, it is important to expand the use of natural antioxidants to investigate the mechanisms underlying these effects and to minimize negative effects. This study was aimed to determine the effects of As on the oxidative damage and genotoxicity and the effects of vitamin C (VitC) on these damages. TM3 Leydig cells were exposed to sodium arsenite (10 ppb) and vitamin C (50 μM) for 24 h. Following the exposure time, Leydig cells were evaluated for cell viability, lipid peroxidation, apoptosis, and formation of micronucleus. The results indicated that As decreased the cell viability and increased the levels of lipid peroxidation and apoptosis. Also, VitC suppressed the formation of micronucleus, which is an indicator of genotoxicity caused by As exposure in Leydig cells. In conclusion, this study found that vitamin C, a natural antioxidant, may have a therapeutic effect against the toxicity of As.

**Keywords:** genotoxicity, Leydig cells, oxidative stress, sodium arsenite, vitamin C.

## INTRODUCTION

Heavy metals are commonly found in the earth and negatively affect the ecosystem. Arsenic is one of the heavy metals in nature. Arsenic is a toxic element that largely spreads to the environment and accumulates as a metalloid in the earth's crust (Susan et al., 2019). People are exposed to arsenic in many ways (Ueki et al., 2004). Among the natural ways is primarily drinking water and the consumption of foods irrigated with arsenic-contaminated water. In addition, pesticides, herbicides, various dyes, cosmetic products, and mining are among the ways people are exposed to arsenic (Smedley and Kinniburgh, 2002). Arsenic toxicity is a global health problem that affects millions of people. It is estimated that over a hundred million people are exposed to a carcinogenic dose of arsenic in worldwide. As a result of many studies, arsenic was classified as a group I human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2004). The pathogenic mechanism of action of arsenic is quite complex and multifactorial. Forming a strong oxidative stress by causing the formation of free radicals in the cell is one of the basic mechanisms of arsenic toxicity (Flora, 2011). Many studies have shown that induction of reactive oxygen species (ROS) plays a critical role in arsenic toxicity. In populations that are chronically exposed to arsenic, DNA damage and lipid peroxidation are observed due to oxidative stress (Basu et al., 2005; Sampayo-Reyes et al., 2010). It has been reported that arsenic causes DNA damage such as aneuploidy, micronuclei formation, chromosomal disorders, deletions, sister chromatid exchange, and DNA-protein cross-linking (Gebel, 2001). Also, arsenic can cause oxidative damage in proteins and enzymes due to the high affinity of proteins and enzymes to sulfhydryl groups and therefore many enzymes are inactivated (Hughes et al., 2011; Wang et al., 2004). Oxidative damage occurring in enzymes also interferes with DNA repair mechanisms by downregulating the gene expression involved in DNA repair, such as DNA ligation inhibition or DNA polymerase (Sinha and Roy, 2011).

Sufficient antioxidants should be consumed to prevent or minimize oxidative stress caused by free radicals. Studies have reported a decrease sperm count and viability and an increase in abnormal sperm count in the absence or insufficiency of VitC (Zubair et al., 2020). *In vivo* and *in vitro* studies with As and VitC, VitC has been shown to have a protective effect against arsenic toxicity (Karasavvas et al., 2005; Banerjee et al., 2009; Mittal et al., 2018; Zubair et al., 2020). Although there are studies investigating the effects of As and VitC

together, there is no study on the role of these two agents in the apoptotic and genotoxic mechanism of Leydig cells.

Leydig cells located between the seminiferous tubules in the testes are the main cells responsible to produce testosterone (Andric and Kostic, 2019). In this study, mouse Leydig cells were used as an *in vitro* model to investigate the effects of As and VitC on apoptosis and genotoxicity. The aim of this study was to evaluate the damage caused by As exposure on TM3 Leydig cells by measuring the parameters of cell viability, oxidative stress, apoptosis, and genotoxicity. In addition, it was investigated whether vitamin C have a protective role in As toxicity.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

The mouse Leydig TM3 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). For the cells, cell culture medium containing 50:50 DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, nutrient mix F12 Ham medium) supplemented with 5% Horse Serum, 2.5% Fetal Bovine Serum, 2.5 mM L-Glutamine, 0.5 mM Sodium Pyruvate, 1.2 g / L Sodium Bicarbonate, 15 mM HEPES and 1% Penicillin-Streptomycin mixture was used. Cells were incubated in sterile conditions with a temperature of 37 °C containing 5% $CO_2$ and 95% air in incubator. Sodium arsenite (Sigma Chemical Company) was dissolved in medium containing 1% horse serum for administration to the cells at a concentration of 10 ppb which was permitted by the World Health Organization in drinking waters. In the experiments, the selected VitC concentration was 50 µM, which was used in *in vitro* studies and was known to be the average antioxidant concentration of VitC. VitC was dissolved in 1% horse serum and freshly prepared.

### Cell viability

The effects of As and VitC on Leydig cell viability were determined by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) kit (Roche, Germany). Leydig cells were seeded in a 96-well cell culture plate for 24 h at a density of 5000 cells per well. The cells were then treated with 10 ppb concentration of As prepared in medium containing 1% horse serum. At the end of the exposure, the kit protocol was applied. The optic intensities of the cells were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) device at a wavelength of 540 nm. The viability of the control cells, which were not treated with the test substance, was assumed to be 100%, and the viability of the experimental cells was expressed in percentages.

### Preparation of samples for biochemical analysis

For biochemical analyses, cells ($1x10^6$ cell / well) were seeded in six-well culture plates and selected As and VitC concentration were applied for 24 hours. At the end of the exposure period, cells were treated with trypsin and taken to Tris-HCl buffer (pH: 7.2). Then, the membranes of the cells were disintegrated by sonication and the resulting cell suspension was centrifuged in 14000 g of refrigerated centrifuge to remove the supernatant. The supernatants were used for the measurement of total protein and lipid peroxidation.

### Measurement of lipid peroxidation

The amounts of lipid peroxidation were calculated according to the amount of malondialdehyde (MDA) present in the sample as in the method of Devasagayam and Tarachand (1987). In the experiment, 0.15 M Tris-HCl and 10 nM $KH_2PO_4$ were added to the sample and blank tubes and the formation of malondialdehyde formed by peroxidation of polyunsaturated fatty acids was provided. Then, the samples were incubated with thiobarbituric acid (TBA) and trichloroacetic acid (TCA) in a boiling water bath for 60 min. The pink-red color of the malondialdehyde formed by TBA was measured spectrophotometrically at a wavelength of 532 nm.

### Detection of apoptosis

Hoechst 33342 (HO342) was used to determine apoptosis in cells and propidium iodide (PI) fluorescence labeling methods were used to determine dead cells. HO342 fluorescent dye marks apoptotic cells in purple color, while PI fluorescent dye marks the dead cells in red color. The combined of these dyes makes it possible to distinguish viable, apoptotic, and dead cell populations with fluorescence microscopy. Cells were seeded in culture well-plates as to be $10^4$ cells per well. After 24 hours of As and VitC administration, the cells were washed with PBS and incubated with PI (1 mg/ml) and HO342 (1 mg/ml) solutions for 20 min at 37 °C. When the experiment was completed, the cells were washed with PBS and examined under fluorescent microscope with UV filter via Olympus IX71 (New York, USA), and photographed in equal intervals on the Olympus

DP72 camera (New York, USA). For each group, viable, apoptotic, and dead cells were counted by screening 10-15 sites and 1000 cells in 12 wells in three different experiments.

**Cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) assay**

The CBMN test was performed as previously described by Fenech (2007). TM3 cells were seeded in six-well plates with $5x10^5$ cells per well. After the exposure period, experimental medium was removed, and cells were exposed to cytochalasin B for 20 h at 4 µg/ml final concentration to obtain binucleated cells. Then, cells were detached by trypsinization after washing with PBS and centrifugation. The supernatant was removed, and the cells were resuspended in hypotonic solution (0.075 M KCl) with 1% formaldehyde. Cells were fixed with Cornay's reagent and cell suspension were centrifuged again. After centrifugation, slides were prepared by dropping cell suspension and air-drying. Slides were stained with 4% Giemsa solution in phosphate buffer ($Na_2HPO_4$ 0.06 M and $KH_2PO_4$ 0.06 M, pH: 6.8) for 8 min and washed with water. Slides were examined using a microscope with a magnification of 40X. To investigate the nuclear division index (NDI), the following formula was used as previously described by Eastmond and Tucker (1989): NDI = [(1 x $N_1$) + (2 x $N_2$) + (3 x $N_3$) + (4 x $N_4$)]/500(the total number of the cells analyzed). $N_1$ - $N_4$ indicate the number of cells with 1, 2, 3, and 4 nuclei.

**Statistical analysis**

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and analysis of variance (ANOVA) was used for comparisons among all groups. Data distribution was tested for normality using the Shapiro-Wilk test. All data was calculated by a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. The results were expressed as mean ± standard error and value of $p<0.05$ was considered statistically significant.

**RESULTS**

**The cell viability results**

Cell viability in Leydig cells exposed to As for 24 h decreased at concentration of 10 ppb (Figure 1). Also, the cell viability increased in As+VitC group compared with only As group ($p<0.05$).

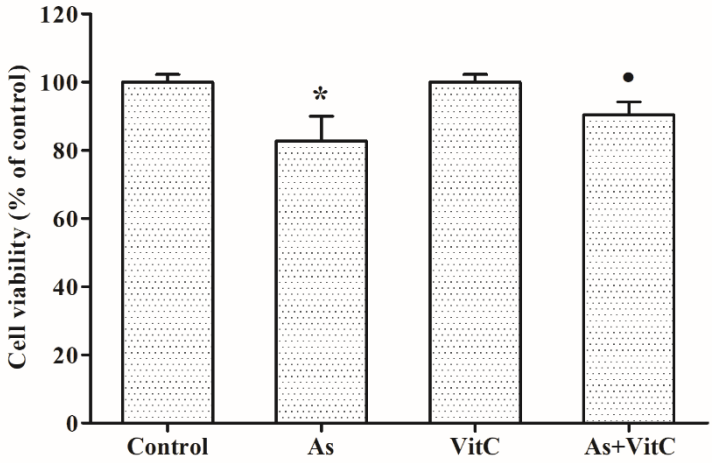



**Figure 1.** Effects of As and VitC on cell viability. All data are presented as the means ± standard error of three independent experiments. Significance at * $p<0.05$. (*) compared with control group, (•) compared with only As group.

**Lipid peroxidation results**

The results showed that lipid peroxidation increased after 10 ppb As exposure ($p<0.05$). When the groups of As and VitC were applied together, it was observed that VitC had an ameliorative effect on the lipid peroxidation caused by As (Figure 2) ($p<0.05$).

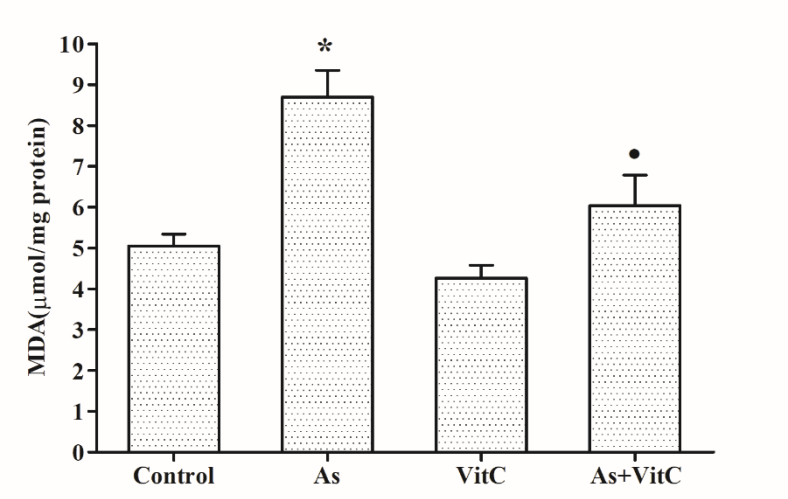



**Figure 2.** The effects of As and VitC on lipid peroxidation. All data are presented as the means ± standard error of three independent experiments. Significance at * p<0.05. (*) compared with control group, (•) compared with only As group.

### Apoptosis results

In As and/or VitC treated Leydig cells, viable, apoptotic, and dead cells were shown by double fluorescence staining method (Figure 3). When the stained cell population is examined: viable cells appear a higher level of blue fluorescence, apoptotic cells appear only a low level of fluorescence, and dead cells appear high-red fluorescence. In table 1, As-exposed Leydig cells were analyzed, a significant decrease was observed at 10 ppb concentration in viable cells and a significant increase was shown in apoptotic and dead cells (*p<0.05). In addition, VitC lead to an amelioration in cell viability at 10 ppb As concentration, while it significantly suppressed dead cell and apoptotic cell rates (*p<0.05).

**Table 1**. Effects of As and VitC co-treatment on viable, apoptotic, and dead cells.

| Groups | Viable cells | Apoptotic cells | Dead cells |
|---|---|---|---|
| **Control** | 95.1 ± 0.4 | 4.6 ± 0.7 | 0.3 ± 0.1 |
| **Control+VitC** | 98.7 ± 0.2 | 1.2 ± 0.6 | 0.1 ± 0.5 |
| **As** | 83.3 ± 0.7 | 12.6 ± 0.9* | 4.1 ± 0.4* |
| **As+VitC** | 91.1 ± 0.6 | 6.1 ± 0.2• | 2.8 ± 0.7• |

Significance at *p<0.05, (*) compared with control group, •p<0.05, (•) compared with As alone group. Each value denotes mean ± SEM of three independent experiments. As: Sodium arsenite, VitC: Vitamin C.

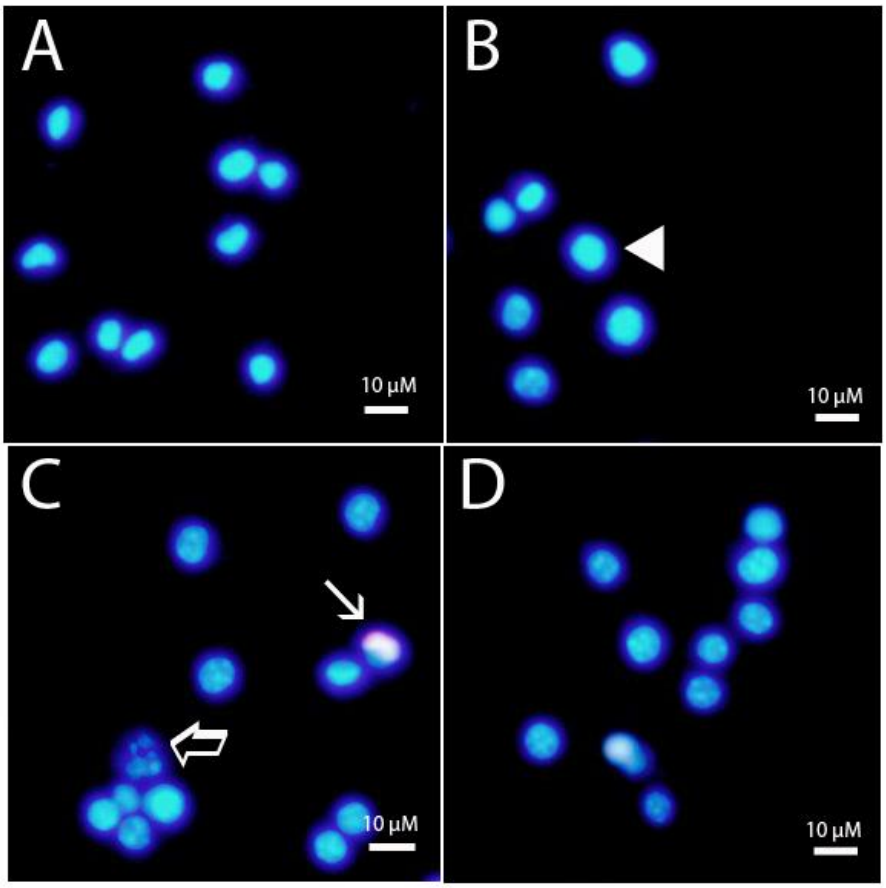



**Figure 3.** Viable, apoptotic, and dead cell findings in 24 h As and VitC exposed TM3 Leydig cells. (A) Control, (B) Control+VitC, (C) As, (D) As+VitC. t: viable cell, d: apoptotic cell, f: dead cell. As: Sodium arsenite, VitC: Vitamin C.

**Micronucleus results**

To determine genotoxic effects in Leydig cells exposed to As and/or VitC, the frequency of micronucleus and nuclear division index were evaluated. The results are shown in Figure 4 and Table 2. $H_2O_2$ was used as a positive control in the micronucleus test. As-exposed group in Leydig cells after 24 h showed no change on the frequency of micronucleus compared to the control group. When the nuclear division index results were compared, a significant increase was found in the 10 ppb As-exposed group (*$p<0.05$). In addition, VitC suppressed the nuclear division index compared to the only As group (*$p<0.05$).

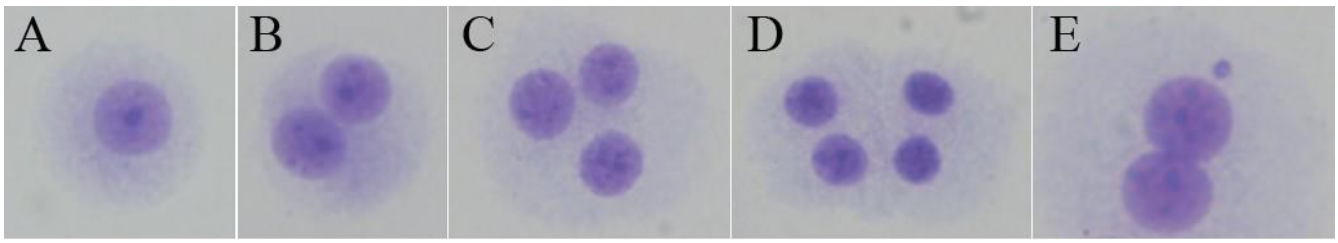



**Figure 4.** Leydig cells exposed to As and VitC and their mixture, and types of nuclear abnormalities observed in the micronucleus test (A) Mononucleated cell, (B) Binucleated cell, (C) Trinucleated cell, (D) Tetranucleated cell (E) Binucleated cells with micronuclei.

**Table 2.** Micronucleus frequency and nuclear division index in As and VitC induced Leydig cells.

| Groups | ‰ Micronucleus | Nuclear division index |
|---|---|---|
| **Control** | 0.5 ± 0.2 | 1.45 ± 0.1 |
| **Control+VitC** | 0.3 ± 0.1 | 1.64 ± 0.3 |
| **As** | 2.2 ± 0.9 | 1.38 ± 0.7* |
| **As+VitC** | 1.3 ± 0.5 | 1.47 ± 0.5• |
| **Positive control ($H_2O_2$)** | 48.03±1.4 | 1.25 ± 0.3 |

Significance at *p < 0.05, (*) compared with control group, •p < 0.05, (•) compared with As alone group. Each value denotes mean ± SEM of three independent experiments. As: Sodium arsenite, VitC: Vitamin C.

## DISCUSSION

Studies have explored the effects of As on cell viability in various cell lines. In cultured human lung adenocarcinoma cells, As was administered for 24 h at 0.125-100 µM concentrations and a significant decrease in cell viability was observed from 10 µM concentration (Jiang et al., 2013). In another study, As was applied to Leydig and Sertoli cells at concentrations of 50 ppb and 1000 ppb for 24, 48 and 72 h. According to the results of the study, As significantly reduced cell viability in Leydig and Sertoli cells (Orta Yilmaz et al., 2018). Exposure at 30 µM arsenic for 24 h was shown to decrease of cell viability in human bronchial epithelial cells (Chen et al., 2013). As has been shown to significantly decrease cell viability in rat liver cells at concentrations of 2 and 4 µM. In As + VitC groups, cell viability was found to increase significantly compared to the As alone group (Bera et al., 2010). In this study, similar to the studies summarized above, it was found that As at 10 ppb concentration reduces cell viability in Leydig cells. A significant increase in cell viability was observed in groups formed by adding 50 µM VitC as an antioxidant to As.

Toxic substances can disrupt the oxidant/antioxidant balance due to the excessive ROS formed in the cell, and the resulting ROS can seriously damage nucleic acids, cell membranes and proteins (Zhang et al. 2010). Studies have shown that arsenic can cause toxicity that results in the production of excessive ROS that cause damage to cellular components (Bera et al., 2010; Orta Yilmaz et al., 2018; Rahman et al., 2018). In a study with rat adrenal gland cells, As was applied at a concentration of 10 µM for 48 hours, and it was revealed that lipid peroxidation significantly increased as a result of the study (Rahman et al., 2018). Orta Yilmaz et al. (2018) reported that As exposure to Leydig and Sertoli cells at 50 ppb and 1000 ppb concentrations caused an increase in lipid peroxidation levels (Orta Yilmaz et al., 2018). In the study with rat liver cells, As at 2 µM and 4 µM concentrations and VitC at 10 µM concentration were applied to cells for 24, 48 and 72 h. As a result of the study, it was shown that there was an increase in lipid peroxidation in As exposed groups, while lipid peroxidation in groups formed by adding VitC significantly decreased compared to As groups (Bera et al., 2010). When blood, liver and kidney tissues were examined for lipid peroxidation, it was reported that lipid peroxidation increased significantly only in the arsenic group, whereas lipid peroxidation was significantly reduced in groups formed by adding vitamins E and VitC (Ramanathan et al., 2002). In this study, As significantly increased lipid peroxidation in Leydig cells, as seen in similar studies above. In the As + VitC group, lipid peroxidation significantly decreased in Leydig cells. The fact that these results were similar to previous studies supported that VitC suppresses arsenic-induced oxidative stress in Leydig cells as in other cell and animal studies (Bera et al., 2010; Ramanathan et al., 2002).

Some previous studies using various cell cultures and animal models suggest that both genotoxicity and apoptosis are important mechanisms for arsenic-induced toxicity. Cellular DNA damage may result from environmental toxic substances, endogenous ROS effects or replication errors (Franco et al., 2009). Genotoxicity includes many complex events in the cell, such as chromosomal disorders, DNA adducts, mutations occurring in genes, and chromosome aberration. Apoptosis occurs as a defense mechanism when these damages enter an irreversible path in cells, especially disease or toxic damage affects cellular DNA. In a study, the role of VitC (10 µg / ml) in the exposure of arsenic (12.5, 25, 50 and 100 µg / ml) was evaluated

in terms of genotoxicity in lymphocytes. As a result of the study, it was found that arsenic increased DNA damage and VitC decreased the genotoxic effects of arsenic (Roy et al., 2014). In peripheral blood lymphocyte culture, sister chromatid exchanges significantly increased in arsenic (0.5, 1 and 2 μg) groups, while the genotoxic effect of arsenic decreased in vitamin A supplemented arsenic groups (Avani and Rao, 2007). In another study with lymphocyte cells, the genotoxic effects of arsenic were investigated by comet and chromosomal aberration experiments. The results showed that VitC effectively ameliorates the genotoxic effect of arsenic by reducing the frequency of chromosomal abnormalities and primary DNA damage (Roy et al., 2015). In a study examining the effects of As and VitC on apoptosis in brain cells, it was observed that As causes apoptosis at a concentration of 0.3 ppm, VitC plays a protective role in this toxicity (Chattopadhyay et al., 2002). Another study investigated the ability of ascorbic acid (200 mg / kg body weight) in rats (100 ppm in drinking water for thirty days) to neutralize the genotoxic effect of arsenic. The results showed that arsenic causes DNA damage and comet formation at the cellular level, while VitC can repress arsenic-related toxicity (Balakumar et al., 2010). In this study with Leydig cells, it was observed that apoptosis increased, and nuclear cleavage index decreased in As exposed groups. VitC was found to suppress apoptosis caused by As toxicity and inhibit genotoxicity by increasing the nuclear division index. The results obtained also support *in vitro* studies on various cell lines (Roy et al., 2015; Avani and Rao, 2007).

## CONCLUSION

According to the results of this study, it was concluded that As causes cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis in Leydig cells, and that it inhibits the antioxidant defense system by causing an excessive increase in lipid peroxidation. VitC has been shown to play a protective role in As toxicity.

## FUNDING

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects (Project No. 29191).

## REFERENCES

Andric SA, Kostic TS 2019. Regulation of Leydig cell steroidogenesis: intriguing network of signaling pathways and mitochondrial signalosome. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research, 6: 7-20.

Avani G, Rao MV 2007. Genotoxic effects in human lymphocytes exposed to arsenic and vitamin A. Toxicology In Vitro, 21(4): 626-631.

Balakumar B, Ramanathan K, Kumaresan S, Suresh R 2010. DNA damage by sodium arsenite in experimental rats: ameliorative effects of antioxidant vitamins C and E. Indian Journal of Science and Technology, 3(3): 322-327.

Banerjee P, Bhattacharyya SS, Bhattacharjee N, Pathak S, Boujedaini N, Belon P, Khuda-Bukhsh AR 2009. Ascorbic acid combats arsenic-induced oxidative stress in mice liver. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(2): 639-649.

Basu A, Som A, Ghoshal S, Mondal L, Chaubey RC, Bhilwade HN, Rahman MM, Giri AK 2005. Assessment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. Toxicology Letters, 159 (1): 100-112.

Bera AK, Rana T, Das S, Bandyopadhyay S, Bhattacharya D, Pan D, De S, Das SK 2010. L-Ascorbate protects rat hepatocytes against sodium arsenite—induced cytotoxicity and oxidative damage. Human and Experimental Toxicology, 29 (2): 103-111.

Chattopadhyay S, Bhaumik S, Purkayastha M, Basu S, Chaudhuri AN, Gupta SD 2002. Apoptosis and necrosis in developing brain cells due to arsenic toxicity and protection with antioxidants. Toxicology Letters, 136(1): 65-76.

Chen C, Jiang X, Hu Y, Zhang Z 2013. The protective role of resveratrol in the sodium arsenite-induced oxidative damage via modulation of intracellular GSH homeostasis. Biological Trace Element Research, 155 (1): 119-131.

Devasagayam TP, Tarachand U 1987. Decreased lipid peroxidation in the rat kidney during gestation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 198: 273-80.

Eastmond DA, Tucker JD 1989. Identification of aneuploidyinducing agents using cytokinesisblocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. Environmental and Molecular Mutagenesis, 13: 34–43.

Fenech M 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols, 2 (5): 1084.

Flora SJ 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. Free Radical Biology and Medicine, 51 (2): 257-281.

Franco R, Cidlowski JA 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. Cell Death and Differentiation, 16(10): 1303-1314.

Gebel TW 2001. Genotoxicity of arsenical compounds. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 203 (3): 249-262.

Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ 2011. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. Toxicological Sciences, 123 (2): 305-332.

IARC 2004. Arsenic in drinking-water, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 267.

Jiang X, Chen C, Zhao W, Zhang Z 2013. Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in A549 cells: an implication for the paradoxical mechanism. Environmental Toxicology and Pharmacology, 36 (3): 891-902.

Karasavvas N, Cárcamo JM, Stratis G, Golde DW 2005. Vitamin C protects HL60 and U266 cells from arsenic toxicity. Blood, 105(10): 4004-4012.

Mittal M, Chatterjee S, Flora SJS 2018. Combination therapy with vitamin C and DMSA for arsenic–fluoride co-exposure in rats. Metallomics, 10(9): 1291-1306.

Orta Yilmaz B, Yildizbayrak N, Erkan M 2018. Sodium arsenite-induced detriment of cell function in Leydig and Sertoli cells: the potential relation of oxidative damage and antioxidant defense system. Drug and Chemical Toxicology, 1-9.

Rahman MM, Uson-Lopez RA, Sikder MT, Tan G, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M 2018. Ameliorative effects of selenium on arsenic-induced cytotoxicity in PC12 cells via modulating autophagy/apoptosis. Chemosphere, 196: 453-466.

Ramanathan K, Balakumar BS, Panneerselvam C 2002. Effects of ascorbic acid and a-tocopherol on arsenic-induced oxidative stress. Human and Experimental Toxicology, 21(12): 675-680.

Roy P, Giri S, Mukherjee A 2014. Vitamin C pretreatment mitigates the genotoxic effects of sodium arsenite in human lymphocytes in vitro. Journal of Applied Biology and Biotechnology Vol, 2(04): 016-020.

Roy P, Mukherjee A, Giri S 2015. Positive effects of Vitamin C in arsenic trioxide and sodium fluoride induced genotoxicity and oxidative stress in mice in vivo. Pollution, 1(4): 451-460.

Sampayo-Reyes A, Hernández A, El-Yamani N, López-Campos C, Mayet-Machado E, Rincón-Castañeda CB, Limones-Aguilar MDL, López-Campos JE, de León MB, González-Hernández S, Hinojosa-Garza D 2010. Arsenic induces DNA damage in environmentally exposed Mexican children and adults, Influence of GSTO1 and AS3MT polymorphisms. Toxicological Sciences, 117 (1): 63-71.

Sinha, D. and Roy, M., 2011, Antagonistic role of tea against sodium arsenite-induced oxidative DNA damage and inhibition of DNA repair in Swiss albino mice, Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 30 (4).

Smedley PL, Kinniburgh DG 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Applied Geochemistry, 17 (5): 517-568.

Susan A, Rajendran K, Sathvasivam K, Krishnan UM 2019. An overview of plant-based interventions to ameliorate arsenic toxicity. Biomedicine and Pharmacotherapy, 109:838–852.

Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR 2004. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the Mouse, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: 10422–10427.

Wang YC, Chaung RH, Tung LC 2004. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. Aquatic Toxicology, 69 (1): 67-79.

Zubair M, Ahmad M, Saleemi MK, Gul ST, Ahmad M, Martyniuk CJ, Ullah Q, Umar S 2020. Sodium arsenite toxicity on hematology indices and reproductive parameters in Teddy goat bucks and their amelioration with vitamin C. Environmental Science and Pollution Research, 1-10.

# Removal of olive mill wastewater (OMW) using H3PO4 treated olive stones (AOLS) as an efficient adsorbent and electrocoagulation process

W. Yassine[a*], Y. Raji[a*], S. Akazdam[a*], S.Zyade[a], B. Gourich[a]

[a]Laboratory of Engineering, Processes and Environment (LEPE) University Hassan II, High School of Technology Casablanca Morocco.

(E-mail: wafaayassenv@gmail.com)

## Abstract

In this work, Olives mill waste water resulting from the extraction of olive oil are the major problem of olive growing because of their polluting power (rich in organic and mineral matter) and their acid pH. The aim of this study is to treat these margins electrochemically in an aluminum electrode reactor, in order to oxidize the organic matter, discolour the margins, neutralize the pH and consequently reduce the pollutant power of this product. Various low cost adsorbents have been studied for their applicability in treatment of different types of effluents. In this study, the potential of activated carbon derived from Olive Stones was studied for the removal of OMW. The biosorption of OMW from aqueous solutions by $H_3PO_4$ treated olive stones (AOLS) as a low-cost, natural and eco-friendly biosorbent was investigated. After this study, it was found that the increase in electrolysis time and the intensity of the current significantly improved the treatment. However, simultaneous energy consumption and electrodes were observed. The results of these analyzes showed that thirty-fold diluted margins are effluents at acid pH (5.02), Conductivity (14.89).The evolution of the physicochemical parameters during the electrocoagulation (EC) treatment shows that under the conditions of an electrolysis time of 3 h and a current intensity of 3A (corresponds to 416 A.m-2), the discoloration Of the margins diluted ten times is between 91%, the reduction of the lost mass of the electrodes is 0.55 kg.m-3 and the reduction of the COD is 50%. These optimal operational levels allow a good degradation of the effects of margins. Biosorption kinetic data were properly fitted with the pseudo-second-order kinetic model. The experimental isotherm data were analyzed using Langmuir, and Freundlich isotherm equation. The best fit was obtained by the Langmuir model with a Langmuir maximum monolayer biosorption capacity of 189.83 mg/g for OMW. The biosorption was exothermic in nature ($\Delta H° = -13.11$ kJ/mol). The reaction was accompanied by a decrease in entropy ($\Delta S° = -72.91$ J/K.mol). The Gibbs energy ($\Delta G°$) increased when the temperature was increased from 303 to 318 °K indicating a decrease in feasibility of biosorption at higher temperatures. The results have established good potentiality for the EC and $H_3PO_4$ treated olive stones (AOLS) to be used as two methods for the removal of olive mill wastewater.

**Keywords:** Adsorption , electrocoagulation, Olive Stones; phenol; eco-friendly biosorbent; Olive Mill Wastewater; Kinetics, Equilibrium; Thermodynamics.

## 1. Introduction:

In this work, Olives mill waste water resulting from the extraction of olive oil are the major problem of olive growing because of their polluting power (rich in organic and mineral matter) and their acid pH. The aim of this study is to treat these margins electrochemically in an aluminum electrode reactor, in order to oxidize the organic matter, discolour the margins, neutralize the pH and consequently reduce the pollutant power of this product. Various low cost adsorbents have been studied for their applicability in treatment of different types of effluents. In this study, the potential of activated carbon derived from Olive Stones was studied for the removal of OMW.

The biosorption of OMW from aqueous solutions by $H_3PO_4$ treated olive stones (AOLS) as a low-cost, natural and eco-friendly biosorbent was investigated. After this study, it was found that the increase in electrolysis time and the intensity of the current significantly improved the treatment. However, simultaneous energy consumption and electrodes were observed. The results of these analyzes showed that thirty-fold diluted margins are effluents at acid pH (5.02), Conductivity (14.89).The evolution of the physicochemical parameters during the electrocoagulation (EC) treatment shows that under the conditions of an electrolysis time of 3 h and a current intensity of 3A (corresponds to 416 $A.m^{-2}$), the discoloration Of the margins diluted ten times is between 91%, the reduction of the lost mass of the electrodes is 0.55 $kg.m^{-3}$ and the reduction of the COD is 50%.

These optimal operational levels allow a good degradation of the effects of margins. Biosorption kinetic data were properly fitted with the pseudo-second-order kinetic model. The experimental isotherm data were analyzed using Langmuir, and Freundlich isotherm equation. The best fit was obtained by the Langmuir model with a Langmuir maximum monolayer biosorption capacity of 189.83 mg/g for OMW. The biosorption was exothermic in nature ($\Delta H° = -13.11$ kJ/mol). The reaction was accompanied by a decrease in entropy ($\Delta S° = -72.91$ J/K.mol). The Gibbs energy ($\Delta G°$) increased when the temperature was increased from 303 to 318 °K indicating a decrease in feasibility of biosorption at higher temperatures. The results have established good potentiality for the EC and $H_3PO_4$ treated olive stones (AOLS) to be used as two methods for the removal of olive mill wastewater.

Authors are requested to submit Abstractsvia the conferencewebsite: http://itmc.esith.ac.ma/participation. Accepted formats are PDF and MS Word. You will have to indicate if you wantto:

- *Contribute with a poster only*
- *Contribute with a poster and write a paper to an indexed Journal, if Scientific Committee agrees*
- *Contribute with a poster and write a paper to ITMC proceedings, if Scientific Committee agrees*

## 2. Material and Methods

### 2.1. Preparation of the biosorbent : Olive Stones

Starting material Olive stones was provided by a factory from Essaouira (Morocco), is very abundant agricultural by-product , and could be a very adequate raw material to obtain good adsorbent. activated carbon prepared chemically from olive stones proved to be an excellent decontaminant of polluted water with heavy metals and organic compounds like phenols . The preparation of the adsorbent was as followed, olive mill waste were washed several times with distilled water at 105c overnight, crushed, sieved. The resulting material was treatment H3PO4 in the adsorption process. FTIR analysis was applied to determine the surface functional groups, using FTIR spectrophotometer (SCO TECH SP-FTIR-1). The FTIR spectral analysis were recorded from 4000 to 400 cm-1 and the samples were prepared as KBr pellets under high pressure [32].

The olive pomace washed with tap water several times to remove dust and impurities, are dried in the oven at 100 ° C for 24 hr in a mortar and weighed in 100 g a flask filled with 500 ml of activating agent ($H_3PO_4$, KOH). The mixture is stirred for a period of one hour at a temperature of 60 ° C using a heater balloon. Then the pomace is filtered and put in the oven until complete evaporation. The dry matter is recovered and crushed and the product sieved by sieves of different pore diameters (0.5, 1 and 1.5 mm) [33].

### *2.2. Industrial waste; Adsorbate-Preparation; Separation of Olives mill wastewater*

The olive mill wastewater were taken from a traditional oil mill in Essaouira, during the 2016-2017 olive-growing season and are vegetation waters diluted 10 times. These have undergone the following pretreatment operations: decanting; Filtrations; Delipidation by means of a separating funnel. No chemical additives are used during the production of olive oil. The **Table 1** below, illustrates an example of OMW (olive mill waste) composition in Essaouira department [34]. After the storage of the samples, the oily and aqueous phases of OMW can be separated either naturally or by centrifugation [35]. Even if they have the same performance, but the slow and the area requirement may limit the first one. The centrifugation allowed us to accelerate the separation of oil and water phase. This separation technique is performed by filling 4 test tubes with 0.250 $dm^3$ of OMW solution, they are then centrifuged at a speed of 4000 rpm during 30 minutes using a centrifuger. The oil, having a lower density than water, will be found above the water in the centrifuger. In order to finally

isolate the oil, it will be collected using an automatic adjustable pipette. Oil percentage was determined using weight difference [36].

**Table 1:** Composition and Characteristics of crude olive mill wastewaters

| Parameters | Values |
|---|---|
| pH | 4.9 |
| Polyphenol [g/ $dm^3$] | 12 |
| Dry matter [g/ $dm^3$] | 13.0 |
| Moisture [%] | 98 |
| Volatile matter [g/ $dm^3$] | 9.5 |
| Ash [g/ $dm^3$] | 3.5 |
| Chemical oxygen demand [g $O_2$/ $dm^3$] | 13 |
| Fatty acid [g/ $dm^3$] | 0.9 |
| Total nitrogen [%] | 0.05 |
| Conductivity [ms/cm] | 5.4 |
| Total sugars [mg/ $dm^3$] | 14 |

## 3. Results and discussion

Thermodynamics experiments were carried out at a temperature range of 20-47°C. **Figure 1**1 shows the plot of ln $K_l$ versus 1/T and the values of estimated thermodynamic parameters are given in Table 4. As can be observed, the negative value of ΔH° (-13.111178 kJ/mol) shows that the adsorption is exothermic as process. The negative value of ΔS° (-72.9146114J/mol.°K) can be used to describe the randomness at the solid/solution interface during the adsorption process. The Gibbs energy(ΔG°) increased from 6.10 kJ/mol to 10.05 kJ/mol with an increase in temperature from 20 to 47 °C indicate a decrease in feasibility of adsorption at higher temperatures and the spontaneous nature of the adsorption. Concerning the evaluation of the activation energy ($E_a$) of the adsorption, the **Figure 1**1 shows a linear relationship between the logarithm of rate constant and the inverse temperature and gives an estimation value $E_a$ =-20.5879582 kJ/mol and $k_0$=10,327 (g/mg.min). The negative values of $E_a$ indicate the presence of an energy barrier in the adsorption and confirming the nature of physisorption processes of OMW on the surface of Olive Stones.

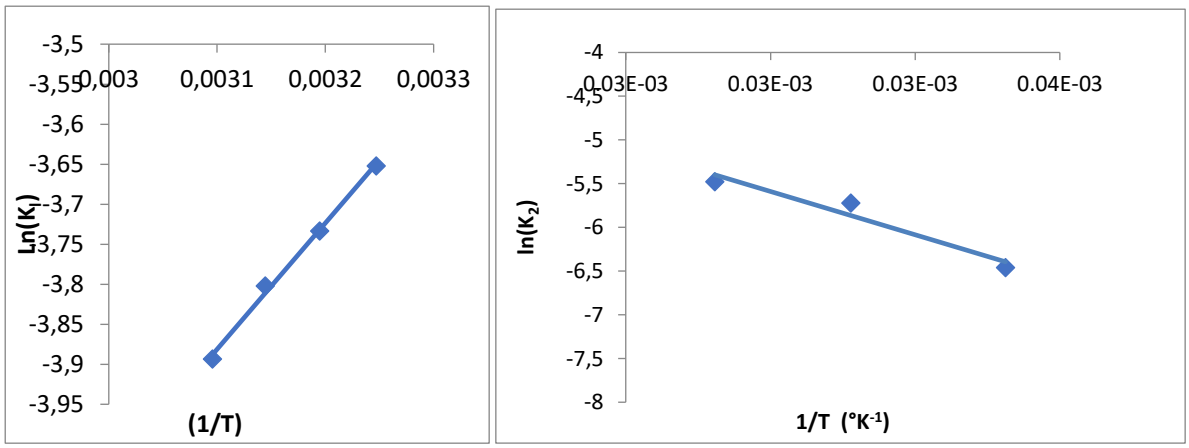



**Figure 11:** Plot of the adsorption of OMW and Arrhenius plots for the adsorption of OMW onto Olive Stones at various temperatures.

**Table 4:** Thermodynamic Parameters Obtained from Isotherm Adsorption of OMW onto Olive Stones

| T (°C) | $K_L$(L/mg) | T (°K) | $10^3$/T(°$K^{-1}$) | Ln(K) | ΔG (KJ/mol) | ΔH (J/mol) | ΔS (J/mol*°K) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20 | 0.0345 | 298 | 3.36 | -3.38 | 8.38 | | |
| 30 | 0.0270 | 303 | 3.30 | -3.61 | 6.10 | -13111.178 | -72.9146114 |
| 47 | 0.0259 | 308 | 3.25 | -3.65 | 9.35 | | |

## 4. Conclusion

The objective of our study was to reduce the negative impact of vegetation waters on nature without prior treatment by the treatment of margins with EC as pretreatment. During the EC of margins, we determined in a first step the PH of the margins before and after the EC of margins. The acidity of the medium has been neutralized, this result makes it possible to affirm that the technique used constitutes a good choice as pretreatment. The COD of the margins of the order of 13.9 g $O_2$/ $dm^3$ confirms the efficacy of EC as the main process of treatment, knowing that our margins had a COD of the order of 32.7 g$O_2$/ $dm^3$. We have carried out this treatment by varying: the concentration of the margins, the margins diluted 20 times are retained as optimum, experience shows that the best results are obtained for a current density of 416 A/$m^2$ under the operating conditions, and For a time (120 min) and a quantity of added salt 2 g/$dm^3$. Liquid discharges thus obtained can be directly discharged into rivers or mixed with urban wastewater to be treated by sewage treatment plants without risk of disrupting the functioning of the latter. The batch adsorption experiments proved that $H_3PO_4$ Treated Olive Stones (TOLS) is a promising abundant, low cost and high capacity adsorbent for the removal of Olive Mill Wastewater (OMW). High adsorption capacity of total Olive Mill Wastewater onto $H_3PO_4$ Treated Olive Stones is observed The adsorption capacity is exponentially increased with initial OMW concentration . The equilibrium time is independent of the concentration and the amount adsorbed at equilibrium increases with concentration. This is because the diffusion of OMW molecules from the solution to the surface of the adsorbent is accelerated by increasing the dye concentration. This work confirms that the Olive Stones could be used for the removal of OMW from aqueous solutions. The adsorbed amount decreases with increasing temperature. Equilibrium studies signify favorable adsorption isotherm for OMW adsorption onto Olive Stones. Langmuir isotherm better represents the equilibrium system than Freundlich isotherm. Results indicate that the adsorption isotherm data were fitted good agreement with the Langmuir isotherm model by comparing the values of the linear correlation coefficient $R^2$.The adsorption process is considered to

be of medium speed at low agitation speed; Equilibrium is almost achieved after 7 hrs of OMW contact with Treated Olive Stones. Kinetic modeling indicates that total OMW adsorption is best represented by pseudo-second order rate. The adsorption process followed pseudo-second order kinetics and was spontaneous and exothermic. This study shows that Olive Stones is an effective adsorbent for removal of OMW from aqueous solutions.

**References**:

[1] D. Simeonov, L. Spasov, P. Simeonova, Statistical calibration of model solution of analytes. Ecol Chem Eng S. Forthcoming 2019.

[2] A. Mittal, L. Kurup, V.K. Gupta, Use of waste materials—bottom ash and de-oiled soya, as potential adsorbents for the removal of amaranth from aqueous solutions. J. Hazard. Mater. 117 (2005) 171-178.

[3] A.Y. Dursun, O. Tepe, Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized Ralstonia eutropha. J. Hard. Mater. 126 (2005) 105-111.

[4] A. Dąbrowski, P. Podkościelny, Z. Hubicki, M. Barczak, Adsorption of phenolic compounds by activated carbon—a critical review. Chemosphere. 58 (2005) 1049-1070.

[5]Dursun **G**, Cicek H, Dursun AY. Adsorption of phenol from aqueous solution by using carbonised beet pulp. J. Hazard. Mater.2005; 125: 175-182.

[6]Fan J, Zhang J, Zhang C, Ren L, Shi Q. Adsorption of 2, 4, 6-trichlorophenol from aqueous solution onto activated carbon derived from loosestrife. Desalination. 2011;267:139-146.

# SonoFenton ve Ultrases/$H_2O_2$ Prosesleri ile Kağıt Endüstrisi Atıksuyundan KOİ Giderimi

Şefika Kaya[1*], Yeliz Aşçı[2]

[*1-2]Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Eskişehir, Türkiye

*sefikakaya@ogu.edu.tr

## Özet

Endüstriyel atıksuların birçoğu, çok yavaş bozunan ya da biyobozunmayan organik maddeleri içermektedir. Klasik atıksu arıtım yöntemleri ile biyolojik arıtmaya dirençli organik bileşikleri uzaklaştırmak güçtür. Bu nedenle, son yıllarda ileri oksidasyon prosesleri, bu organik kirleticileri indirgemek için yüksek verim sağlayan alternatif bir yöntem haline gelmiştir. Bu çalışmada üretim prosesleri aşamasında büyük miktarlarda su tüketiminin gerçekleştiği ve organik kirliliğinin yüksek olduğu bilinen kağıt endüstrisi atıksuyu kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalarda sonoFenton ve ultrases/$H_2O_2$ prosesleri uygulanarak kağıt endüstrisi atıksuyundan KOİ giderimi incelenmiştir. Elde edilen verilere göre ultrases ve Fenton reaktiflerinin birlikte uygulandığı sonoFenton prosesinde daha yüksek KOİ giderim verimine (%88) ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Fenton, ultrases, endüstriyel atıksu, arıtım.

# COD Removal Study from Paper Industry Wastewater with SonoFenton and Ultrasound Processes

## Abstract

Many of the industrial wastewaters contain very slowly degrading or non-biodegradable organic materials. It is difficult to remove organic compounds resistant to biological treatment by conventional wastewater treatment methods. Therefore, in recent years, advanced oxidation processes have become a high-yield alternative method for reducing these organic pollutants. In this study, paper industry wastewater, which is known to have large amounts of water consumption in the production processes and high organic pollution, was used. In the experimental studies, the COD removal from the paper industry wastewater was investigated by applying sonoFenton and ultrasound/$H_2O_2$ processes. According to the obtained data, higher COD removal efficiency (88%) was achieved in sonoFenton process where ultrasound and Fenton reagents were applied together.

**Keywords:** Fenton, ultrasound, industrial wastewater, treatment.

## GİRİŞ

Uzun yıllardır yapılan çalışmalarda, endüstriyel atıksuların arıtımında modern teknolojiler kullanarak düşük maliyette yüksek arıtım verimine ulaşmak zor olmuştur. Bu nedenle biyolojik ve fiziko-kimyasal arıtım yöntemleri ilk tercih edilen yöntemler haline gelmiştir (Gagol vd., 2018). Klasik atıksu arıtım yöntemleri ile biyolojik arıtmaya dirençli organik bileşikleri uzaklaştırmak güçtür. Bu nedenle son yıllarda ileri arıtma yöntemleri arasında, daha az işletim problemlerine sahip ve diğer ileri arıtma yöntemlerine nazaran daha yüksek arıtma verimi sağlayan ileri oksidasyon prosesleri, endüstriyel atıksuların arıtımında kullanılan yöntemler arasında ön plana çıkmıştır (Gogate ve Pandit, 2004).

İleri oksidasyon prosesleri, yüksek elektrokimyasal oksidasyon potansiyeline sahip hidroksil radikallerinin oluşumuna dayanmaktadır. Hidroksil radikalleri seçici olmayıp tüm organik maddeler ile reaksiyona girerler ve son ürün olarak $CO_2$ ve $H_2O$ oluştururlar (Martinez vd., 2003). SonoFenton prosesi, ultrasonik ses dalgaları ile sudaki kimyasal kirleticilerin hızla bozunmasını sağlayan gelişmiş bir ileri oksidasyon işlemidir. Ultrases; katı, sıvı ve gazlardan geçebilen, insan kulağı tarafından algılanamayan ses dalgaları olarak tanımlanabilir.

Yüksek enerjili ses dalgaları bir sıvı içinden geçtikleri zaman baloncuk veya kavitasyon oluştururlar. Bu esnada oluşan reaktif türleri (·OH, ·H, ·$HO_2$, $H_2O_2$) radikal zincir reaksiyonlarını başlatmaktadır (Eren, 2018).

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, üretim proseslerinde su tüketiminin fazla olması nedeniyle dünyadaki en önemli atıksu kaynaklarından biridir. Bu endüstrisinin en önemli üretim prosesi olan kraft (sülfat) prosesi sonucunda, beyazlatma (ağartma) amacıyla kullanılan biyolojik olarak ayrışması zor olan klorlu bileşikler, atıksuyun KOİ içeriğine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Sert, 2006). Bu kapsamda kağıt endüstrisi atıksuyundan KOİ giderimi üzerine çalışmalar yürütülmüştür. SonoFenton ve ultrases/$H_2O_2$ prosesleri uygulanarak en uygun deneysel koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır.

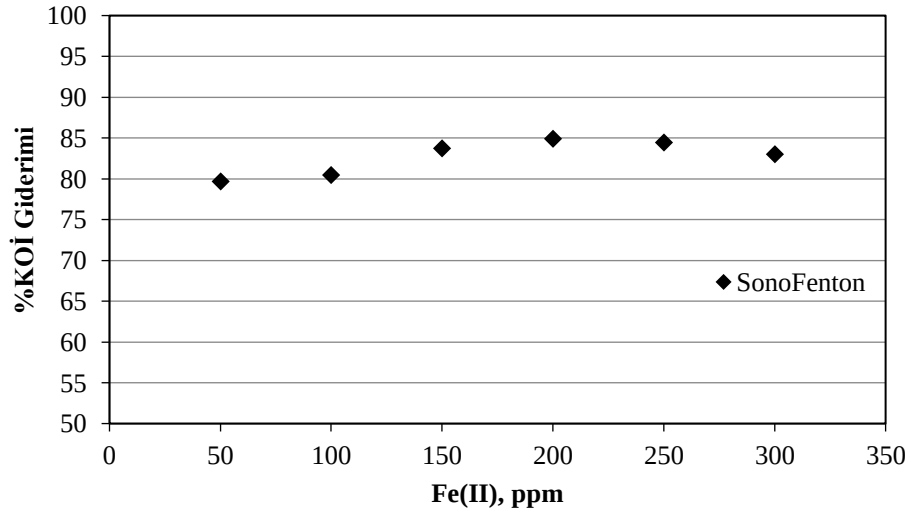
## MATERYAL VE METOT

Deneysel çalışmalar, hurda kağıttan ağartılmamış selüloz üretimi yapan bir işletmeden temin edilen atıksu ile yürütülmüştür. Kullanılan atıksuyun başlangıç KOİ değeri 6320 mg/l olarak belirlenmiştir. SonoFenton ve ultrases/$H_2O_2$ prosesleri deneyleri ultrasonik homojenizatör (20 kHz ve 750 W) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalarda öncelikle atıksu numunesinin pH'ı istenen değere ayarlanmıştır. Daha sonra sonoFenton prosesi çalışmalarında Fe(II) ve $H_2O_2$ çözeltileri, ultrases/$H_2O_2$ prosesi çalışmalarında sadece $H_2O_2$ çözeltisi numuneye eklenmiştir. Ultrasonik homojenizatör cihazının 13 mm'lik probu numune içerisine yaklaşık 4 cm derinliğinde daldırılarak cihaz çalıştırılmıştır. Belirlenen deney süresi sonunda numuneye gerekli ölçümler yapılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### -Fe(II) derişiminin etkisi

Demir iyonları hidrojen peroksiti katalizleyerek hidroksil radikalleri oluşumunu sağladığından önemli parametrelerden biridir. Demir iyonu derişiminin KOİ giderim verimi üzerine etkisi sadece sonoFenton prosesi için çalışılmıştır. Ultrases/$H_2O_2$ prosesi deneysel çalışmasında demir çözeltisi kullanılmamaktadır. Bu kapsamda deneysel çalışmalar pH ve $H_2O_2$ değerleri sabit tutularak, Fe(II) derişimi 50-100-150-200-250-300 ppm değerlerinde yürütülmüştür.



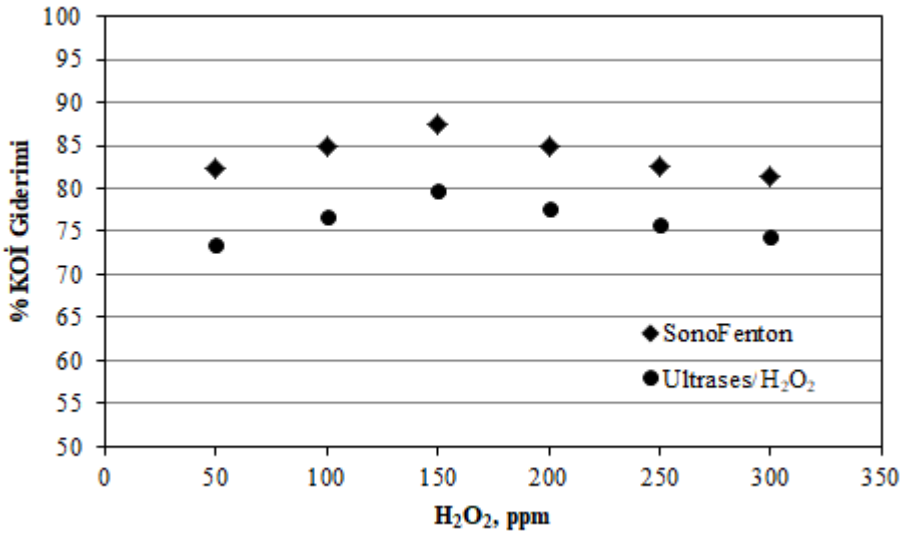

**Şekil 1.** Kağıt endüstrisi atıksuyu KOİ giderim veriminin Fe(II) derişimi ile değişimi (pH=3, $H_2O_2$=200 ppm, reaksiyon süresi 2 saat).

Şekil 1 incelendiğinde, demir derişimi arttıkça KOİ giderim veriminin arttığı görülmüştür. Demir iyonlarının $H_2O_2$ üzerindeki katalitik etkisinden dolayı, demir iyonlarının derişimi arttığında, ortamdaki ·OH radikalinin miktarı artar (Tamimi vd., 2008). Ancak ortamda fazla demir iyonunun bulunması KOİ giderimi üzerinde olumsuz etki yaratabilir. Bu, tutucu olarak işlev gören fazla demir iyonlarının gösterdiği inhibisyon etkisinden

kaynaklanmaktadır (Brink vd., 2017). En uygun demir iyonu derişimi %85 KOİ giderim veriminin elde edildiği 200 ppm olarak belirlenmiştir.

**-$H_2O_2$ derişiminin etkisi**

Hidrojen peroksit, hidroksil radikali kaynağıdır ve uygulanan bu oksidasyon proseslerinde demir iyonlarının katalitik etkisi yanında ultrasonik ses dalgaları ile de parçalanarak hidroksil radikalleri üretirler. Deneysel çalışmalarda en uygun hidrojen peroksit derişimini belirlemek için sabit pH ve Fe(II) derişiminde (sadece sonoFenton için) 50-300 ppm aralığında çalışmalar yürütülmüştür.

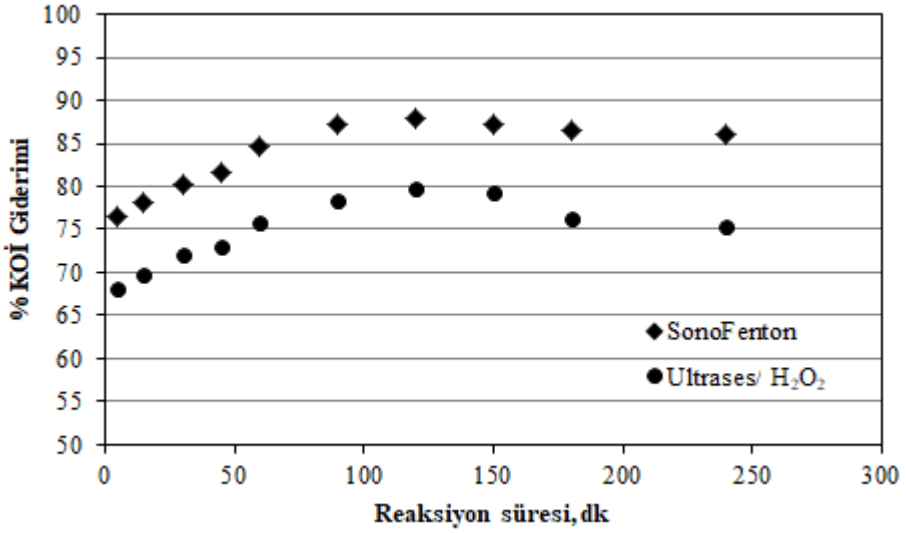



**Şekil 2.** Kağıt endüstrisi atıksuyu KOİ giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, Fe(II)=200 ppm (sonoFenton için), reaksiyon süresi 2 saat).

SonoFenton prosesi uygulandığında elde edilen KOİ giderim veriminin ultrases/$H_2O_2$ prosesine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan hidrojen peroksitin hem demir iyonu hem de ultrasonik ses dalgaları tarafından parçalanması ile daha fazla hidroksil radikali oluşumundan kaynaklanmaktadır (Eren, 2018). Bununla birlikte hidrojen peroksit derişimin artması ile her iki proses için KOİ giderim verimi artmış ancak 150 ppm değerinden daha yüksek derişimlerdeki çalışmalarda azalmaya başlamıştır. Bu durum aşırı hidrojen peroksit ilavesinin hidroksil radikali oluşumunu engellemesi ve süpürme etkisinden kaynaklanmaktadır (Daneshvar vd., 2007). Daha yüksek hidrojen peroksit derişimlerinde çalışıldığında ortamdaki fazla $H_2O_2$ hidroksil radikalleri ile tepkimeye girmektedir. Sonuç olarak KOİ giderim verimi yüksek derişim değerlerinde azalmaktadır (Firdous vd., 2018). Her iki deneysel proses için en uygun hidrojen peroksit derişimi 150 ppm olarak belirlenmiştir.

**-Reaksiyon süresinin etkisi**

Reaksiyon süresinin etkisi çalışmasında 5-240 dakika aralığında farklı reaksiyon sürelerinde çalışılmış elde edilen deneysel sonuçlar Şekil 3'te verilmiştir. pH, hidrojen peroksit derişimi ve demir iyonu derişimi gibi parametreler sabit tutulmuştur.




**Şekil 3.** Kağıt endüstrisi atıksuyu KOİ giderim veriminin reaksiyon süresi ile değişimi (pH=3, Fe(II)=200 ppm (sonoFenton için), $H_2O_2$=150 ppm).

SonoFenton ve ultrases/$H_2O_2$ prosesleri için en uygun reaksiyon süresi 120 dakika olarak belirlenmiştir. SonoFenton prosesinde 120. dakikada en yüksek KOİ giderimi %88 olarak elde edilmiştir. Ultrases/$H_2O_2$ prosesinde ise 120 dakika reaksiyon süresi sonunda %80 KOİ giderim verimi elde edilmiştir.

## SONUÇ

Kağıt endüstrisi atıksuyundan KOİ giderim veriminin incelendiği bu çalışmada sonoFenton ve ultrases/$H_2O_2$ prosesleri karşılaştırılmıştır. En uygun deneysel koşulların belirlenmesi amacıyla demir iyonu derişimi, hidrojen peroksit derişimi ve reaksiyon süresi gibi parametreler incelenmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlara göre sonoFenton prosesi uygulandığında %88 KOİ giderimi ve ultrases/$H_2O_2$ prosesi uygulandığında %80 KOİ giderimi sağlanmıştır. SonoFenton prosesinde Fenton reaktifleri ve ultrasonik ses dalgalarının birlikte uygulanması KOİ giderim verimini arttırmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 201615059 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

Brink A, Sheridan CM, Harding KG 2017.The Fenton oxidation of biologically treated paper and pulp mill effluents: A performance and kinetic study. Process Safety and Environmental Protection, 107: 206-215.

Daneshvar N, Rasoulifard MH, Khataee AR, Hosseinzadeh F 2007. Removal of C.I. acid orange 7 from aqueous solution by UV irradiation in the presence of ZnO nanopowder. Journal of Hazardous Materials, 143(1-2): 95-101.

Eren Z 2018. Su Kaynaklarındaki İlaç Kalıntılarının İleri Oksidasyon Yöntemleri ile Arıtılabilirliğinin İncelenmesi. Academic Platform Journal of Engineering and Science, 6-3: 153-163.

Firdous N, Shaikh IA, Shahid R 2018. Decolorization of Reactive Azo Dye Remazol Black B by Using Advanced Oxidation Processes (AOPs). Journal of the Chemical Society of Pakistan, 40: 828-833.

Gagol M, Przyjazny A, Boczkaj G 2018. Wastewater Treatment by Means of Advanced Oxidation Processes Based on Cavitation - A Review. Chemical Engineering Journal, 338: 599-627.

Gogate PR, Pandit AB 2004. A Rewiev of Imperative Technologies for Wastewater Treatment I: Oxidation Technologies at Ambient Conditions. Advances in Environmental Research, 8: 501-551.

Martinez NSS, Fernandez JF, Segura XF, Ferrer AS 2003. Pre-oxidation of an extremely polluted industrial wastewater by the Fenton's reagent. Journal of Hazardous Materials, B101: 315-322.

Sert, N.D., 2006, İlaç Endüstrisi Atıksularında Fenton Prosesi ile Renk ve KOİ Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 81s.

Tamimi M, Qourzal S, Barka N, Assabbane A, Ait-Ichou Y 2008. Methomyl degradation in aqueous solutions by Fenton's reagent and the photo-Fenton system. Separation and Purification Technology, 61: 103-108.

# Fe(III) İyonu İçeren $MnO_2$ Katalizörü ile Endüstriyel Atıksu Arıtımı: Heterojen Fenton

Şefika Kaya[1*], Yeliz Aşçı[2]

[*1-2]Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Eskişehir, Türkiye

*sefikakaya@ogu.edu.tr

## Özet

Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte biyolojik arıtıma göre daha kısa sürede ve daha etkin arıtım sağlayan ileri oksidasyon prosesleri ile yapılan çalışmalar öne çıkmaktadır. Bu kapsamda yürütülen çalışmalarda, geniş yüzey alanlı ve bozunma işlemlerinde daha yüksek aktivitelere sahip yeni hetero-katalizörlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmada, %8 Fe(III) iyonu içeren $MnO_2$ katalizörü sentezlenerek tekstil endüstrisi atıksuyundan renk ve KOİ giderimi üzerine deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Belirlenen optimum deneysel koşullarda %90 renk ve %63 KOİ giderim verimi sağlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Heterojen Fenton, katalizör, endüstriyel atıksu, arıtım.

# Industrial Wastewater Treatment by $MnO_2$ Catalyst Containing Fe(III) Ion: Heterogeneous Fenton

## Abstract

With the developing technology in recent years, studies with advanced oxidation processes that provide more effective treatment in a shorter time than biological treatment come to the fore. In this context, it is come into important to develop new hetero-catalysts with large surface area and higher activities in degradation processes. In this study, $MnO_2$ catalyst containing 8% Fe(III) ion was synthesized and experimental studies on color and COD removal from textile industry wastewater were carried out. 90% color and 63%COD removal efficiencies were achieved under the determined optimum experimental conditions.

**Keywords:** Heterogeneous Fenton, catalyst, industrial wastewater, treatment.

## GİRİŞ

Geleneksel arıtma yöntemlerinin atıksulardaki kirlilikleri deşarj standartlarına ulaştırmada yetersiz kalması endüstrilerin ileri arıtma teknolojilerine ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. İleri oksidasyon prosesleri, son yıllarda tercih edilen alternatif arıtım yöntemlerinden biridir. Bu prosesler, alternatif yollarla hidroksil radikallerinin üretimi nedeniyle çok yönlü teknolojiler olarak da adlandırılırlar. Ayrıca organik kirleticilerin bozunması sırasında daha az toksik ara ürün üretir ve geleneksel arıtma tekniklerine göre daha verimlidirler (Bethi vd., 2016). İleri oksidasyon prosesleri asidik koşullar altında hidroksil radikalleri (·OH) üreten bir katalitik oksidasyon işlemidir. Demir tuzları, hidrojen peroksitin ayrışması için bir katalizör görevi görür ve hidroksil radikali üretir (Rahmani, 2017).

Heterojen Fenton proseslerinde kullanılan katalizörlerin gözenek boyutu, kristal yapısı ve yüzey alanı gibi fizikokimyasal özellikleri, katalitik aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır. Bu alanda yapılmış çalışmalarda en çok kullanılan katalizörlerin başında yeryüzünde bol miktarda bulunan magnetit, hematit, martit, goetit, pirit ve zeolit gibi demir mineralleri gelmektedir (Arimi, 2017; Khatee vd., 2016; Kakavandi vd., 2016; Wang vd., 2015). Son yıllarda çevre uygulamalarında yarı iletken metal oksitler tercih edilmektedir. Yarı iletkenler; bir tanesi elektron diğeri de boş enerji seviyesi içeren iki farklı enerji bandına sahiptir. İletkenlerin aksine, iletkenlik bandı ile valens bandı arasında bir boşluk bandı bulunur. Yüksek oksidasyon potansiyellerine sahip boşluklar nedeniyle her tür organik bileşiği oksitleyebilirler (Nikravan, 2015). Ayrıca katalizörler reaksiyondan sonra kolayca geri kazanılabilir ve art arda yapılan işlemler sırasında aktif kalır (Soon ve Hameed, 2013).

Tekstil endüstrisinde üretim prosesleri aşamasında büyük miktarlarda su kullanılmakta ve bu da büyük miktarlarda atıksu ile sonuçlanmaktadır. Boşaltılan atıksu, yüksek renk ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) değerine sahiptir (Feng vd., 2010). Bu çalışmada tekstil endüstrisi atıksuyundan heterojen Fenton prosesi ile renk KOİ giderimi incelenmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere ağırlıkça %8 demir iyonu içeren Fe(III)/$MnO_2$ katalizörü sentezlenmiştir.

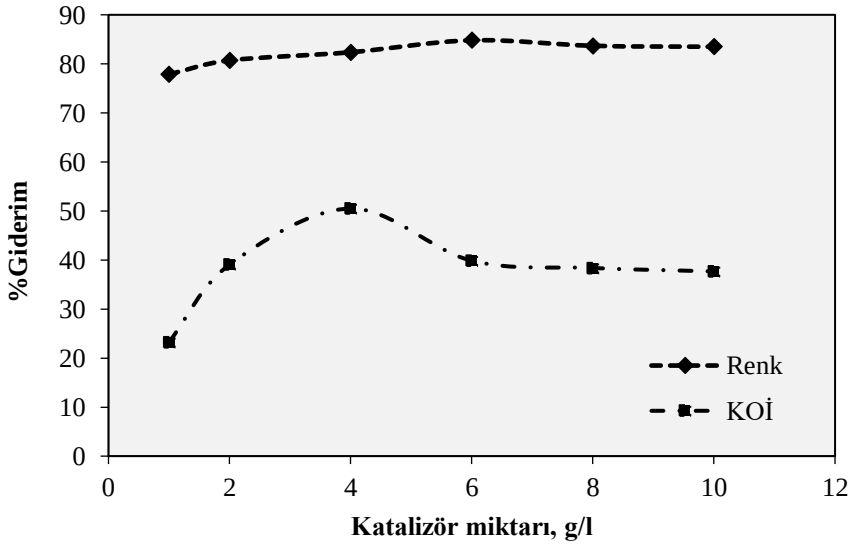
## MATERYAL VE METOT

Deneysel çalışmalarda tekstil endüstrisi atıksuyu kullanılmıştır. Bursa ilinde faaliyet gösteren baskılı perdelik ve tül üretimi yapan bir işletmenin reaktif boyama işlemi çıkış suyundan temin edilmiştir. Atıksuyun başlangıç KOİ değeri 2535 mg/l olarak ölçülmüştür. Çöktürme yöntemiyle sentezlenen ağırlıkça %8 demir iyonu içeren Fe(III)/$MnO_2$ katalizörü ile heterojen Fenton prosesi deneyleri yürütülmüştür. Bu kapsamda deneysel çalışmalarda öncelikle istenen pH değerine ayarlanan atıksuya belli miktarda katalizör ilave edilmiştir. Numuneye $H_2O_2$ çözeltisi eklenerek çalkalamalı su banyosunda sabit sıcaklıkta çalkalanmıştır. Reaksiyon süresi sonunda numuneye santrifüj işlemi uygulanarak katalizör ve çözelti ayrılmıştır. Çözelti filtre edilerek gereken analizler yapılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### -Katalizör miktarının etkisi

Heterojen Fenton prosesi deneysel çalışmaları; pH, $H_2O_2$ derişimi, sıcaklık ve reaksiyon süresi gibi parametreler sabit tutularak 1,0 ile 10,0 g/l aralığında altı farklı katalizör miktarında gerçekleştirilmiştir.

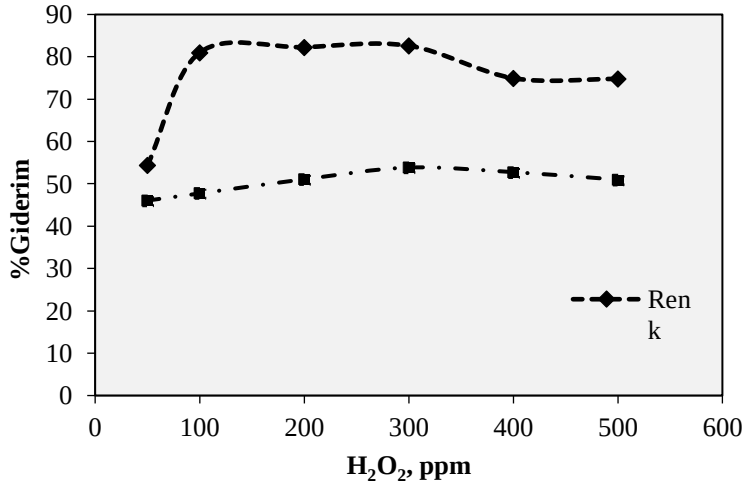



**Şekil 1.** Tekstil endüstrisi atıksuyu renk ve KOİ giderim verimlerinin katalizör miktarı ile değişimi (pH=2, $H_2O_2$=200 ppm, sıcaklık 30°C, reaksiyon süresi 2 saat).

Heterojen Fenton prosesinde reaksiyon katalizörün yüzeyinde gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak katalizör miktarının artması, katalizör yüzeyinde daha fazla aktif bölge varlığı ve daha fazla hidroksil radikali oluşumu sağlamaktadır (Idel-aouad vd., 2011). Katalizör miktarının atıksudan renk ve KOİ giderimi üzerine etkisini incelediğimiz çalışmada artan katalizör miktarı ile renk ve KOİ giderim verimlerinin 4,0 g/l değerine kadar arttığı sonucuna varılmıştır. Şekil 1'de verildiği üzere daha yüksek katalizör miktarlarında çalışıldığında ise KOİ giderim veriminin azaldığı görülmüştür. En uygun katalizör miktarı 4,0 g/l olarak belirlenmiştir.

**-$H_2O_2$ derişiminin etkisi**

Deneysel çalışmalarda belirlenen en uygun katalizör miktarları sabit tutularak hidrojen peroksit derişimi etkisi araştırılmıştır. Hidrojen peroksit derişimi 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 ppm değerlerinde incelenmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar Şekil 2'de verilmiştir.

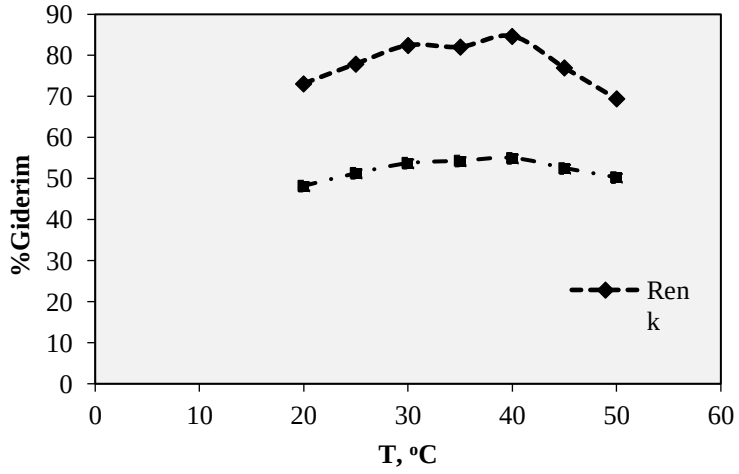



**Şekil 2.** Tekstil endüstrisi atıksuyu renk ve KOİ giderim verimlerinin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (m=4,0 g/l, pH=2, sıcaklık 30°C, reaksiyon süresi 2 saat).

Şekli 2 incelendiğinde artan hidrojen peroksit derişimi ile renk ve KOİ giderim verimlerinin arttığı sonucuna varılmıştır. Hidrojen peroksit derişimindeki artış ortamdaki hidroksil radikali miktarını arttırmaktadır. Bu durum renk ve KOİ giderim verimleri üzerinde olumlu etki yaratmaktadır. Ancak ortamda gereğinden fazla hidrojen peroksit varlığı hidroksil radikalleri ile tepkimeye girmesi ve hidroperoksil ($H_2O\cdot$) oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Oluşan hidroperoksil radikalleri hidroksil radikallerine kıyasla çok daha az reaktiftirler ve organik kirleticilerle oksidatif bozunmaya katkıda bulunmazlar. Bununla birlikte ortamdaki hidroksil radikalleri ile tepkimeye girerek arıtım veriminin düşmesine neden olurlar (Bouasla vd., 2010; Ji vd., 2011). Deneysel verilere göre en uygun hidrojen peroksit derişimi 300 ppm olarak belirlenmiştir.

**-Sıcaklığın etkisi**

Sıcaklık değişiminin renk ve KOİ giderimi üzerine etkisini incelemek için 20-50°C aralığında sıcaklık değerleri değiştirilerek deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Katalizör miktarı, pH ve hidrojen peroksit derişimi parametreleri sabit tutulmuştur.

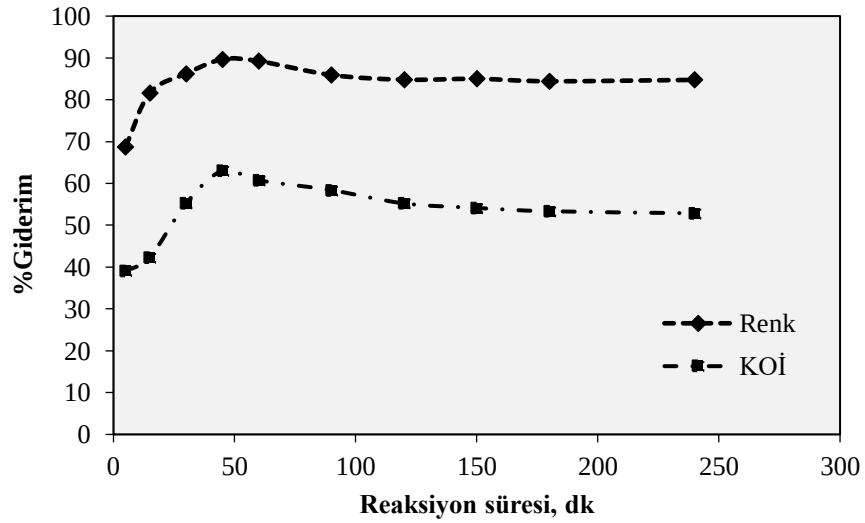



**Şekil 3.** Tekstil endüstrisi atıksuyu renk ve KOİ giderim verimlerinin sıcaklık ile değişimi (m=4,0 g/l, pH=2, $H_2O_2$=300 ppm, reaksiyon süresi 2 saat).

Deneysel verilere göre, sıcaklık değeri 20°C'den 40°C'ye yükseldiğinde renk ve KOİ giderim verimleri de yükselmiştir. Sıcaklık değeri 40°C olduğunda %85 renk ve %55 KOİ giderim verimine ulaşılmıştır. Bu durum yüksek sıcaklık değerinin, hidrojen peroksit ve katalizör arasındaki reaksiyon hızını arttırması ve buna bağlı olarak hidroksil radikalinin üretim hızının da artması ile açıklanabilir. Ancak daha yüksek sıcaklıklarda oksidasyon reaksiyonu aşamaları sırasında hidrojen peroksitin termal ayrışması gerçekleşir ve renk ve KOİ giderim verimleri düşer. Bu nedenle 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda deneysel çalışmaların yürütülmesi önerilmez (Ayodele vd., 2012).

**-Reaksiyon süresinin etkisi**

Reaksiyon süresinin tekstil endüstrisi atıksuyu renk ve KOİ giderimi üzerine etkisinin incelenmesi kapsamında 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 ve 240 dakika gibi farklı reaksiyon sürelerinde deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler Şekil 4'te verilmiştir.




**Şekil 4.** Tekstil endüstrisi atıksuyu renk ve KOİ giderim verimlerinin reaksiyon süresi ile değişimi (m=4,0 g/l, pH=2, sıcaklık 40°C, $H_2O_2$=300 ppm).

İleri oksidasyon proseslerinin en büyük avantajı reaksiyon sürelerinin düşük olması ve kısa sürede yüksek giderim verimi sağlamalarıdır. Şekil 4'te görüldüğü gibi tekstil atıksuyundan renk ve KOİ giderimi çalışmasında ilk 60 dakika içinde giderim verimleri artmış daha sonra sabit kalmıştır. En uygun reaksiyon süresi olarak belirlenen 45 dakikada en yüksek renk (%90) ve KOİ (%63) giderim verimi elde edilmiştir.

## SONUÇ

Yapılan çalışmada, heterojen Fenton prosesi uygulanarak tekstil endüstrisi atıksuyundan renk ve KOİ giderim verimleri incelenmiştir. Çöktürme yöntemi ile sentezlenen Fe(III)/$MnO_2$ katalizörü kullanılarak deneysel çalışmalar yürütülmüştür. En uygun deneysel koşullar; katalizör miktarı 4,0 g/l, hidrojen peroksit derişimi 300 ppm, sıcaklık 40°C ve reaksiyon süresi 45 dakika olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında %90 renk ve %63 KOİ giderim verimine ulaşılmıştır. Elde edilen yüksek artıtım verimi sonucunda Fe(III)/$MnO_2$ katalizörü ile yapılan heterojen Fenton prosesi tekstil endüstrisi atıksuyu arıtımında uygulanabilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 201615059 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

Arimi MM 2017. Modified natural zeolite as heterogeneous Fenton catalyst in treatment of recalcitrants in industrial effluent. Progress in Natural Science: Materials International, 27: 275-282.

Ayodele OB, Lim JK, Hameed BH 2012. Pillared montmorillonite supported ferric oxalate as heterogeneous photo-Fenton catalyst for degradation of amoxicillin. Applied Catalysis A, 413-414: 301-309.

Bethi B, Sonawane SH, Bhanvase BA, Gumfekar SP 2016. Nanomaterials-based advanced oxidation processes for wastewater treatment: A review. Chemical Engineering and Processing:Process Intensification, 109: 178-189.

Bouasla C, Samar M, Ismail F 2010. Degradation of methyl violet 6B dye by the Fenton process. Desalination, 254: 35-41.

Feng F, Xu Z, Li X, You W, Zhen Y 2010. Advanced treatment of dyeing wastewater towards reuse by the combined Fenton oxidation and membrane bioreactor process. Journal of Environmental Sciences, 22(11): 1657–1665.

Idel-aouad R, Valiente M, Yaacoubi A, Tanouti B, Mesas ML 2011. Rapid decolourization and mineralization of the azo dye C.I. Acid Red 14 by heterogeneous Fenton reaction. Journal of Hazardous Materials, 186: 745-750.

Ji F, Li C, Zhang J, Deng L 2011. Efficient decolorization of dye pollutants with $LiFe(WO_4)_2$ as a reusable heterogeneous Fenton-like catalyst, Desalination 269: 284-290.

Kakavandi B, Takdastan A, Jaafarzadeh N, Azizi M, Mirzaei A, Azari A 2016. Application of $Fe_3O_4$/C catalyzing heterogeneous UV-Fenton system for tetracycline removal with a focus on optimization by a response surface method. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 314: 178-188.

Khataee A, Gholami P, Sheydaei M 2016. Heterogeneous Fenton process by natural pyrite for removal of a textile dye from water: Effect of parameters and intermediate identification. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 58: 366-373.

Nikravan A 2015. Amoxicillin and Ampicillin Removal from Wastewater by Fenton and Photo-Fenton Processes. M.Sc. Thesis, Hacettepe University, 123 p.

Rahmani A 2017. Heterogeneous Fenton Oxidatıon Process Using Natural Martite And Hydrogen Peroxide For Treatment Of Color in Water. M.Sc. Thesis, Middle East Technical University, 201 p.

Wang Y, Gao Y, Chen L, Zhang H 2015. Goethite as an efficient heterogeneous Fenton catalyst for thedegradation of methyl orange. Catalysis Today, 252: 107-112.

Soon AN, Hameed BH 2013. Degradation of Acid Blue 29 in visible light radiation using iron modified mesoporous silica as heterogeneous Photo-Fenton catalyst. Applied Catalysis A, 450: 96-105.

# A Novel and Efficient Disinfection Modelling with BiOCl/Bent catalyst against variety Microorganisms under Visible Light

Öge ARTAGAN[1], Ali İmran VAİZOĞULLAR[1]

[1] Medical Service and Techniques Department, Vocational School of Health Services,

Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla, Turkey

email: ogebasoglan@mu.edu.tr

aliimran@mu.edu.tr

## Abstract

In the present study photocatalytic disinfection of *E. Coli, C. Albicans, S. Aureus, P.aureginosa* by BiOCl/Bent sample was tested under visible light. The new composite catalyst which highly active under the visible light was synthesized by immobilizing onto Bentonite surface using BiOCl materials (BiOCl/Bent). For this sample in situ participant technique was used. The samples were characterized by using SEM, XRD, BET, UV-DRS techniques. SEM figures indicate that BiOCl/Bent samples are platelet structure. XRD results presents that there is no effective shifting on characteristic 2 theta degrees indicating efficient dispersion onto Bentonite surface. Where, Bentonite clay was used to increase the functional surface area of the photocatayst. The obtained BET surface area of the samples shows that BiOCl/Bent catalyst was lower than pure Bentonite. UV-DRS results shows the shifting to red region (>380 nm). It can thus be suggested that BiOCl/Bent catalyst is useful material to remove some microorganism under visible light. The aim of the research was to evaluate the efficiency of photocatalytic disinfection with (BiOCl/Bent). composite against *E. Coli, C. Albicans, S. Aureus, P.aureginosa* under visible light. The obtained results show that when *E. coli* strain was subjected to BiOCl/Bent photocatalytic disinfection agent under visible light, more than 99% of the targeted *E. coli* was inactivated within 2 hours and also 100% of *S. aureus* colonies were inactivated within 4 hours under visible light.

**Keywords:** Photocatalytic disinfection, (BiOCl/Bent) *E. Coli, C. Albicans, S. Aureus, P.aureginosa*

## INTRODUCTION

This research provides to set up a solar energy-induced photocatalytic disinfection system of microorganism, focusing on the development of highly efficient photocatalysts and their potential in bacterial inactivation. The synthesis process of photocatalyst, bacterial disinfection properties and conditions are investigared in detail. The current research on photocatalytic disinfection of bacteria, is expected to offer advantageous insights for the future development of the method. Photocatalysis has attracted attention under visible light irradiation for many years all over the world [1, 2, 3, 4]. The possibility of using solar energy in photocatalytic disinfection system may significantly reduce the cost of the disinfection methods [5, 6]. The photocatalytic process is an alternative method for the removal of organic pollutants in the environment. Air disinfection, Medical Applications, Laboratory and Hospital equipments, Pharmaceutical and Food Industry, Plant Protection Applications, Wastewater and Effluents, DrinkingWater Disinfection [7]. In order to achive the disinfection reaction clearly, microorganisms, are required to be in contact with to the photocatalyst functional surface area [8].

The objective of the research was to evaluate the inactivation of four different microorganisms (*E. Coli, C. Albicans, S. Aureus, P.aureginosa)* under visible light by BİOCl-BENT photocatalyst.

## MATERIALS AND METHOD

### Photocatalyst İmmobilization

All materials were of analytical grade except Bentonite and they were used without purification. To synthesize BiOCl-Bent catalysts 7.5 g of raw bentonite was stirred in a 200 ml of $H_2O$ (Solution A). 7.325 g of $Bi(NO_3)_3.5H_2O$ were dissolved in 50 ml of concentrate HCl and then it was added to the

Solution A slowly. This mixture was stirred for an hour and aged for 24 hours. The obtained solid particles were dried at 90°C for 3 hours and calcined at 200°C for 4 hours.

**Antimicrobial Activity on Bioball**

The antimicrobial susceptibility profile of BiOCl-Bent was determined by Broth Microdilution method (BMD). BioBall MultiShot 10E8 is a freeze dried water soluble ball containing a precise number of viable cells. BioBall is produced to the world's highest quality standards, achieving ISO Guide 34, a standard for reference material producers, accreditation. Each BioBall was rehydrated in 1.1 mL Re-Hydration Fluid containing 10 doses of 100 uL with $10^7$ cfu each, resulting in a target concentration of $5 \times 10^5$ cfu per mL when inoculated in 20 mL of Nutrient Broth (NB) [9]. Each well of the 96 well plate was filled with 100 uL of each antimicrobial drug concentrations (0.5- 512 µg/mL) and 100 uL of microorganism stock culture was added. After that, plates were incubated at 35°C (±1for 24 h in aerobic conditions; the test was performed in triplicate. After incubation, 20 uL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) dye was added to each well and viability was evaluated.

**Bacterial Strains and Growth Conditions**

*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans* BioBall MultiShot 10E8 were used. Nutrient agar for bacteria was prepared and diluted to 25 ml of petri dishes for the purpose of studying the surviving microorganisms. The material was weighed at 250 µg/mL and incubated with microorganisms. At the 2nd and 4th hours samples were taken, incubated in day light, specimens taken, transferred to new petri dishes and incubated for 24 hours at 37 ° C, then the colonies were counted.

**RESULTS AND DISCUSSION**

**XRD** Analysis

XRD analysis of BiOCl-Bent sample is presented in Figure 1. From the Figure 1, the characteristic peaks of BiOCl and Bentonite peak at ~23°C are seen in XRD pattern. The characteristic XRD peaks of BiOCl have not changed and its characteristic peak are sharply confirming the high crystallinity. Also it is presented that Bentonite has not changed the crystallite structure of BiOCl.

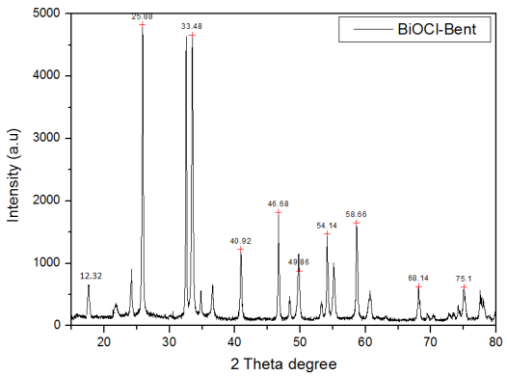



**Figure 1.** XRD result of BiOCl-Bent sample

**SEM analysis**

SEM analysis shows that Bentonite is cottony like morphology. Also BiOCl-Bent sample is platelet structure with Bentonite. The platelet dimensions are 50-100 nm approximately. BiOCl platelets are irregular form.

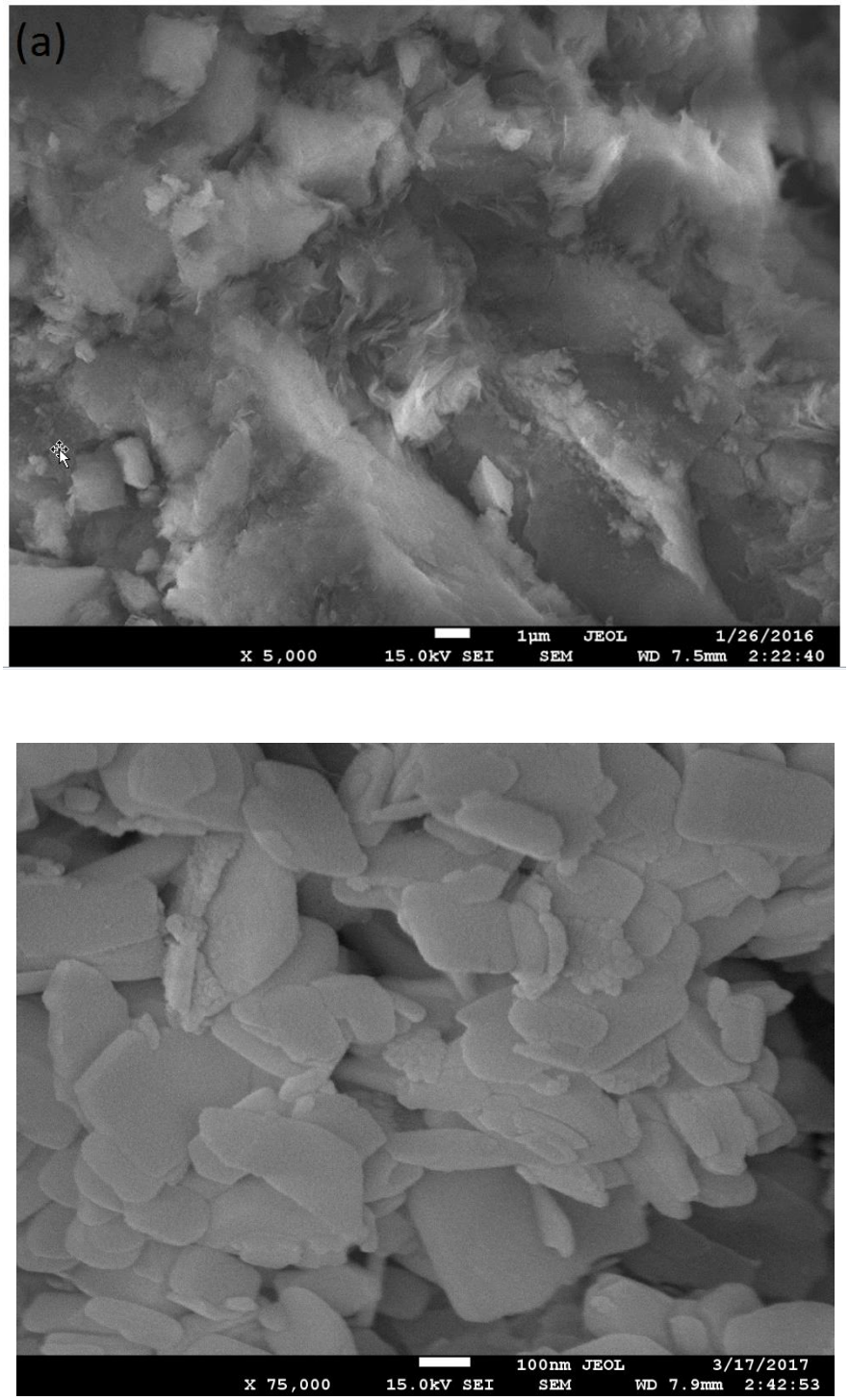



**Figure 2.** SEM images of Bentonite (a), and BiOCl-Bent (b)

**UV-DRS results**

Figure 3 presents UV-DRS results of the samples. From the Figure 3, pure BiOCl exhibits an absorption peak at UV region. However, Bentonite supported sample shows a shifting to visible region. It is suggested that BiOCl-Bent catalyst can be used under visible light irradiation. The estimated band gap value of BiOCl-Bent is 2.89 eV approximately.

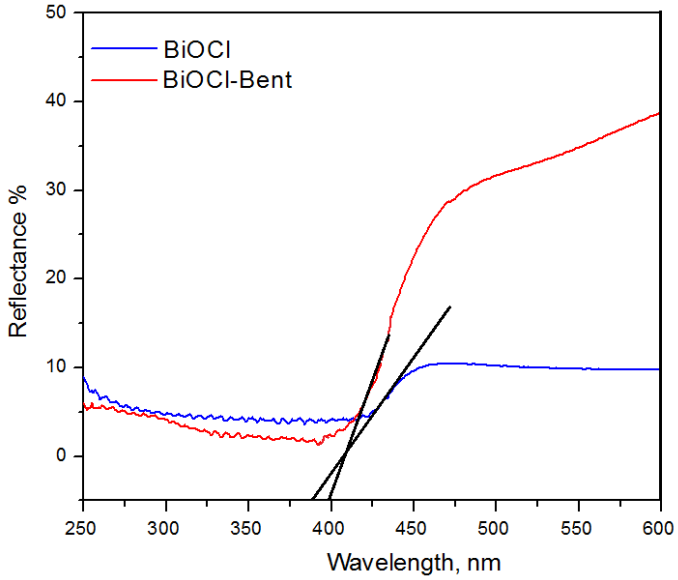



**Figure 3.** UV-DRS spectra of the samples

**Disinfection Studies**

In this research photocatalytic disinfection efficiency was evaluated using a variety of test organisms (*C. Albicans, E. Coli, S. Aureus, P.aureginosa*).

Figure 4 shows plates with ***C. albicans*** colonies in initial concentration, with 2 hours of incubation with the photocatalyst and with 4 hours of incubation with the catalyst. Photocatalytic disinfection by BiOCl-Bent against ***C. albicans*** reached maximum level at the end of 4 hours (Figure 5). Within 2 hours of photocatalytic disinfection value was 75 % (Table 1).

Figure 6 shows plates with ***S. aureus*** colony. Photocatalytic disinfection efficiency against ***S. aureus*** was reached its maximum level in a time dependent manner at the end of 4 hour (Figure 7). After 2 hours of visible light exposure 56% of ***S. aureus*** were inactivated. Photocatalytic disinfection by BiOCl-Bent against ***S. aureus*** reached 100% within 4 hours (Table 1).

When *E.coli* cultivated plates (Figure 8) were subjected to BiOCl-Bent photocatalytic system under visible-light. Photocatalytic disinfection efficiency of BiOCl-Bent against *E. coli* was reached 99,7 % within 2 hours (Figure 9, Table 3). *E. coli* inactivation was better at the end of 2 hours incubation. 88 % of *E.coli* colony were inactivated within 4 hours (Table 1).

*P. aeruginosa* cultivated plates were shown in Figure 10. *P. aeruginosa* inactivation was achived better at the end of 2 hours incubation (Figure 11). 74 % of *P. aeruginosa* colony inactivation was performed at the end of 2 hours of photocatalysis under visible light (Table 1).

Disinfection achieved using the BiOCl-Bent was also validated for safety and reuseable for environmental contaminants. The well organized photocatalytic process may be useful in designing an efficient, low cost, decontamination system.

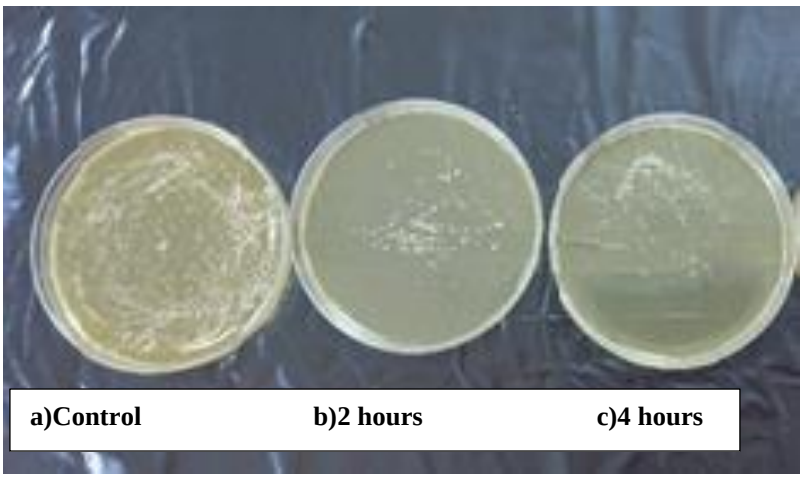



**Figure 4:** Plates with *C. albicans* colony: a) Control, b) 2 hours of incubation with photocatalyst, c) 4 hours of incubation with photocatalyst.

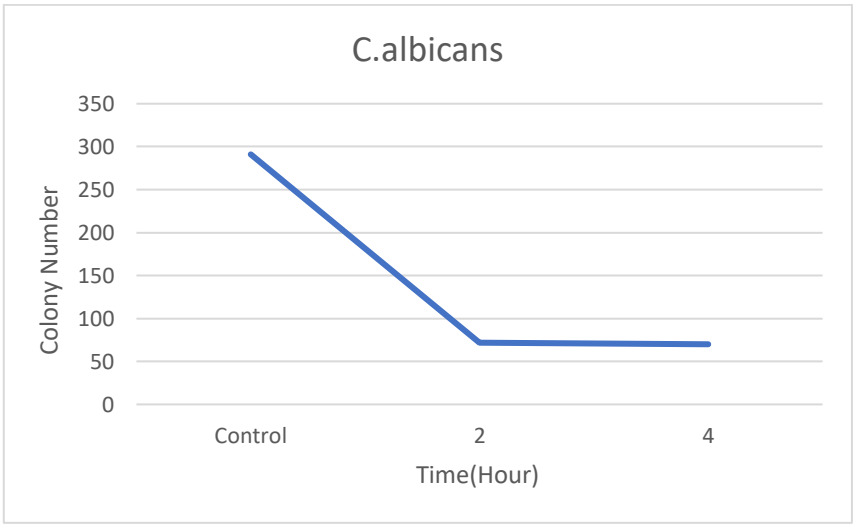



**Figure 5:** The antimicrobial capacity of photocatalyst a under visible light.

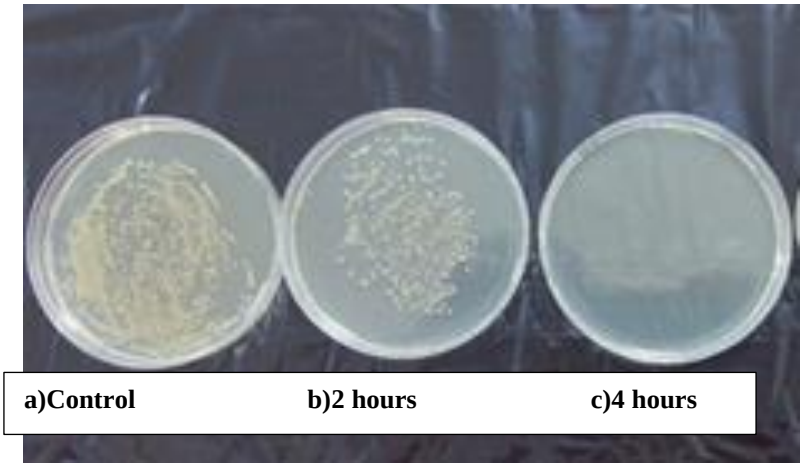



**Figure 6** Plates with *S. aureus* colony: a) Control, b) 2 hours of incubation with photocatalyst, c) 4 hours of incubation with photocatalyst.

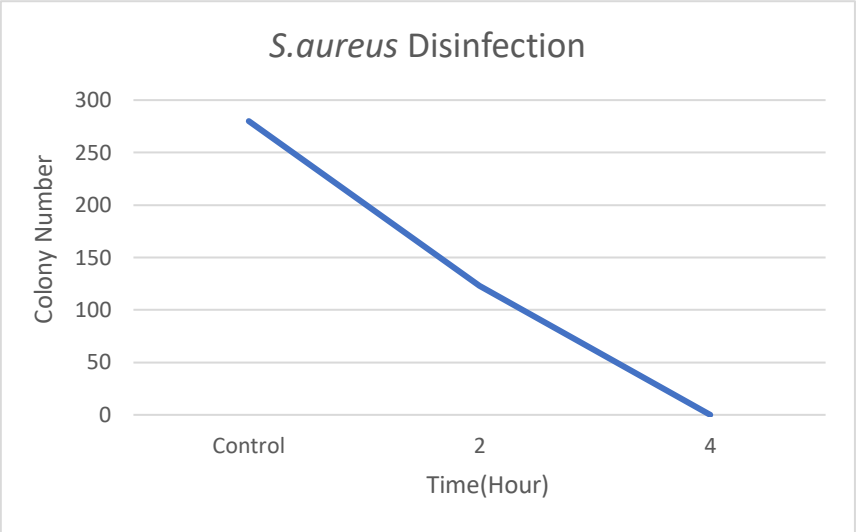



**Figure 7:** The antimicrobial capacity of photocatalyst under visible light.



**Figure 8:** Plates with E. coli colony: a) Control, b) 2 hours of incubation with photocatayst, c) 4 hours of incubation with photocatalyst**.**

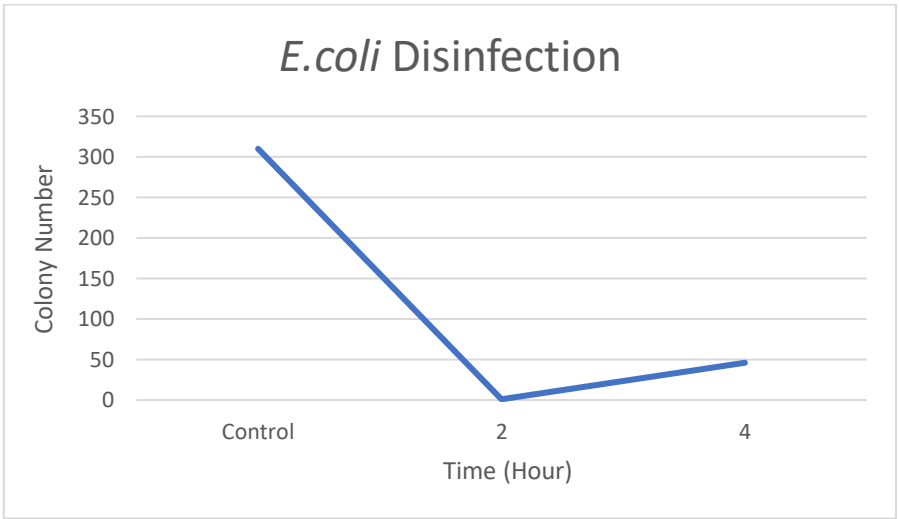



**Figure 9:** The antimicrobial capacity of photocatalyst activity under visible light.



**Figure 10:** Plates with *P. aeruginosa* colony: a) Control, b) 2 hours of incubation with photocatalyst, c) 4 hours of incubation with photocatalyst.

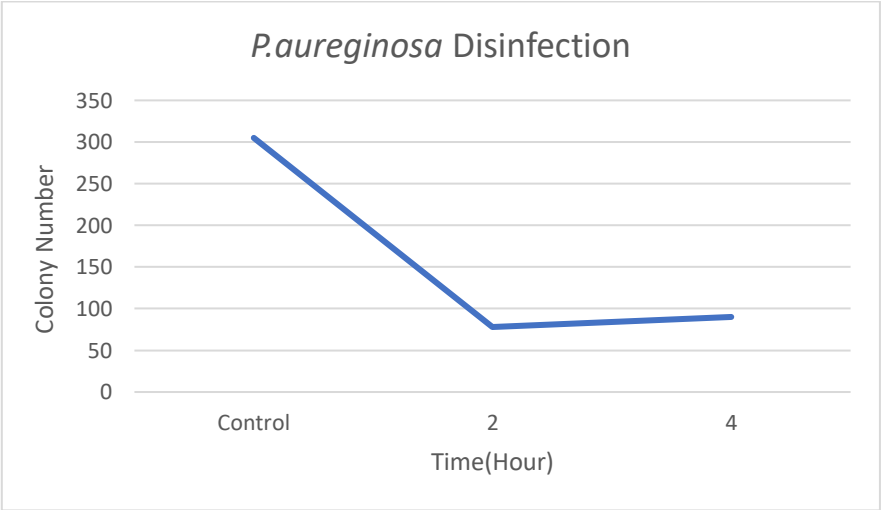



**Figure 11:** The antimicrobial capacity of photocatalyst under visible light.

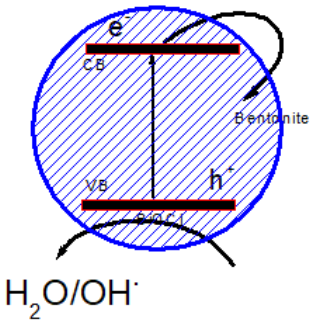
**Table 1:** Microbicide activities of BiOCl-Bent against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* respectively.

| **Microbicide activities of photocatalyst** | **2 Hours Incubation** | **4 Hours Incubation** |
|---|---|---|
| ***E. coli*** | **%99,7** | **%85** |
| ***S.aureus*** | **%56** | **%100** |
| ***P.aureginosa*** | **%74** | **%70** |
| ***C.albicans*** | **%75** | **%76** |

From the Figure 9 when excited the BiOCl-Bent catalyst under visible light the valence band electrons transferred to its conductive band level. In this case, the charge carries which are holes and electrons reacted with $H_2O$ and $O_2$ to form hydroxide ($OH^-$) and superoxide ($O_2^{-\cdot}$) radicals respectively. This oxidation process caused to inactivate the microorganisms.

**Possible degradation mechanism**

When visible light irradiated, the excited electrons in CB level are captured by electron acceptors like oxygen, in this case superoxide radicals forms. This oxidative species can produce hydro peroxide radicals (HOO). Consequently, it is results hydrogen peroxide ($H_2O_2$) which ultimately brings about degradation of cell. Also the excited electron can have transferred to bentonite to inhibit recombination of electron hole pairs.




**Sheme 1**. Possible degradation mechanism

## CONCLUSION

In summary *and P. aeruginosa*. The second one is higher adsorption ability in the BiOCl-Bent system.

The photocatalysts with clay had better antibacterial ability under visible light; photocatalysts modified with BiOCl-Bent reduced 100% of *S.aureus* after 4 hour of exposure. Also % 99,7 of E. coli inactivated under visible light irradiation at the end of 2 hours.

## References

[1] Carp O., Huisman C.L., Reller A., Solid State Chem., 2004, 32, 33.

[2] B. Priya, P. Shandilya, P. Raizada, T.N. Singh, P. Singh, J. Mol.Catal. A: Chemical 423, 400 (2016)

[3] Malato S., Blanco J., Vidal A., Richter C., Appl. Catal. B: Environ., 2002, 37, 1.

[4] Mitoraj D., Jańczyk A., Strus M., Kirsch H., Stochel G., Heczko P.B., Macyk W., Photochem. Photobiol. Sci., 2007, 6, 642.

[5] M. Janus, A. Markowska-Szczupak, E. Kusiak-Nejman, A.W. Morawski. Disinfection Of E. Coli By Carbon Modified Tio2 Photocatalysts. Environment Protection Engineering. Vol. 38 2012 No. 2

[6] W. Wang, G. Huang, C.Y. Jimmy, P.K. Wong, Journal Of Environmental Sciences 34, 232 (2015).

[7] J. Gamage, Z. Zhang, Applications Of Photocatalytic Disinfection, International Journal Of Photoenergy, 1, 2010

[8] Dalrymple OK., Stefanakosa E., Trotzb MA., Goswamia DY. 2010. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. Applied Catalysis B: Environmental 98, 27–38.

[9] E. Gündoğdu, C. Koksal, E. Karasulu, Drug Development and Industrial Pharmacy 38(6), 689 (2012).

# Listeriosis outbreaks

Simge Aktop [1*], Pınar Şanlıbaba[1]

[*1]Ankara University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Ankara, Turkey

*Corresponding author e-mail: saktop@ankara.edu.tr

## Abstract

*Listeria monocytogenes* is one of the most important foodborne pathogens, often associated with a lethal disease, Listeriosis. Therefore, it is of great importance for food safety and public health. Listeriosis is a serious infection caused by consumption of food contaminated with *L. monocytogenes*, which can develop at low temperatures and high salt concentrations. In cases reported by the European Food Safety Authority (EFSA) and Centers for Disease Control and Prevention (CDC), consumption of ready-to-eat foods such as smoked and dried fish, soft/semi-soft cheese, heat-treated meat and salads is often reported to cause Listeriosis outbreaks. In addition to, experts report that the development of *L. monocytogenes* in home-made and refrigerated foods is responsible for one-third of Listeriosis outbreaks. While low doses of *L. monocytogenes* are not a problem for healthy individuals, susceptibility to this pathogen occurs for immunocompromised individuals, sensitive individuals such as newborn, pregnant and elderly. According to EFSA data, Listeriosis outbreaks increased between the two groups of the population between 2008 and 2015. These two groups include people over 75 and women aged 25-44. According to the CDC data, approximately 1600 people catch Listeriosis each year and approximately 260 of them die. In 2015, EFSA reported that approximately 2200 people were affected by the Listeriosis outbreak, causing the deaths of 270 people, the highest number reported in the European Union (EU). The number of Listeriosis outbreaks, which was 2509 in 2016, decreased to 2480 in 2017. However, Listeriosis outbreaks have tended to increase since 2008. In 2019, CDC reported 10 people infected with Listeriosis outbreak resulting in the death of one person and resulting from deli-sliced meat and cheese in the United States. EFSA reported that cold smoked seafood plays a leading role in the Listeriosis outbreaks in 2019. In this study, Listeriosis outbreaks published by EFSA and CDC will be summarized.

**Keywords:** CDC, EFSA, *Listeria monocytogenes*, Listeriosis outbreaks

## INTRODUCTION

Listeriosis is a serious infection that usually results from consuming foods contaminated with *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* is a Gram-positive bacteria that can grow at temperatures below 5ºC. *L. monocytogenes* can be found in foods such as fruits and vegetables, meat and meat products, soft cheeses, seafood, ready-to-eat foods, and unpasteurized milk (Lassen et al., 2016). *L. monocytogenes* can cause serious diseases such as septicemia, meningitis, conjunctivitis, localization of the skin and mucosa in humans (Okpo et al., 2015; Gu et al., 2015). Taking this pathogen at low doses does not cause serious problems in healthy individuals. However, pregnant, elderly, newborns and immunocompromised individuals are sensitive to *L. monocytogenes* and this pathogen causes important health problems in these individuals (Buchanan et al., 2017; Nichols et al., 2020; Stratakos et al., 2020). *L. monocytogenes* can cause Listeriosis due to high morbidity and mortality in these individuals (Cossart and Lebreton, 2014; Gu et al., 2015). In addition, about 17% of Listeriosis cases occur in pregnant women (Zhu et al. 2017). *L. monocytogenes* can pass from the placenta to the fetus. In such cases, abnormalities such as stillbirth, premature death and abortion may occur (Desai et al., 2019). Approximately 1,600 people are observed with Listeriosis every year and 260 people die (CDC, 2020a).

Antibiotics can be successfully used in the treatment of *L. monocytogenes* infections. Despite this, the mortality rates caused by this pathogen can reach 20-30%. This mortality rate is the highest mortality rate for a foodborne pathogen (Zhu et al., 2017; Stratakos et al., 2020). *L. monocytogenes* can survive in food processing environments with its high stress tolerance characteristics. Thus, *L. monocytogenes*, which is taken into the body with foods, effectively passes to the gastrointestinal system of the host and survives here, causing disease (Stratakos et al., 2020).

**Listeriosis outbreaks**

Food-borne outbreaks are often described as diseases that result from two or more people consuming the same contaminated food. The CDC's multi-stage foodborne outbreak reports, which include Listeria cases from 2011 to 2020 will be summarized in this study. In Figure 1, numbers of Listeriosis cases are shown according to CDC reports.

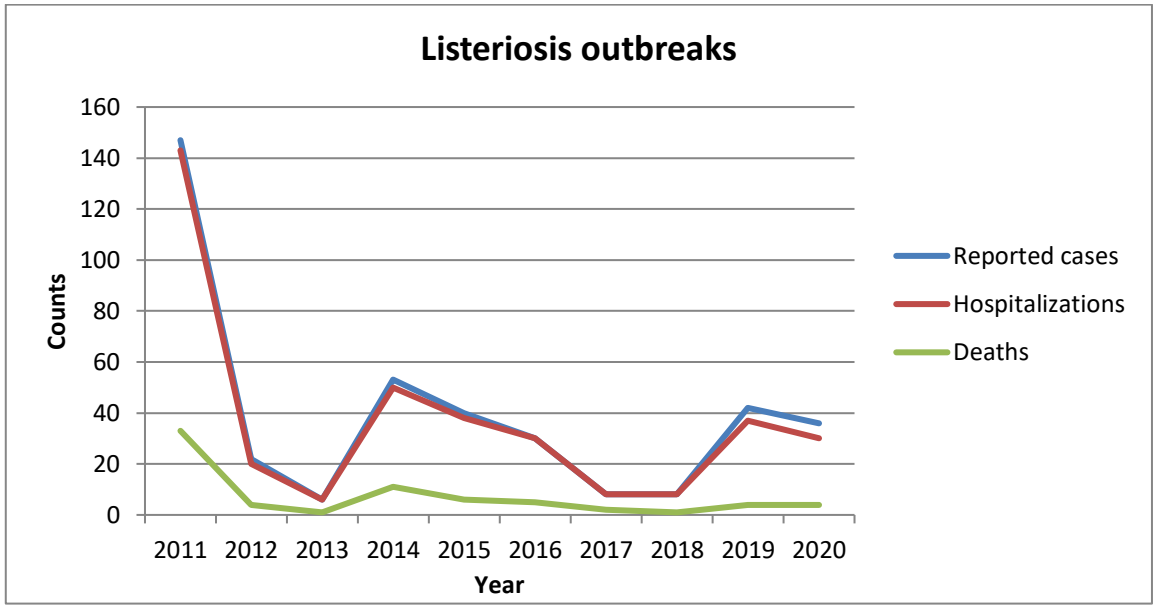



**Figure 1.** Listeriosis cases between 2011-2020 according to CDC reports (CDC, 2020c)

When the chart is analyzed, it is seen that the Listeriosis outbreak that caused the most death according to CDC reports was caused by cantaloupe in 2011. 147 people infected with *Listeria* in the cantaloupe have been reported. This outbreak resulted in the death of 33 people. It is stated that seven of the cases are related to pregnant women and newborns. In addition to, the majority of patients are individuals over 60 years old, and 99% of patients are hospitalized (CDC, 2011). Table 1 lists the Listeriosis cases, the products causing the epidemic, the number of hospitalizations and deaths for 2011-2020 according to the CDC reports.

In 2012, a multi-stage Listeriosis outbreak associated with Ricotta salad cheese was reported. It was reported that 22 people were affected by this outbreak and 20 people were hospitalized. In this outbreak that resulted in the death of four people, the producer company had this cheese removed from the market (CDC, 2012).

A total of six infected individuals have been reported in the Listeriosis outbreak of cheese-borne in 2013. All six patients were hospitalized and the outbreak resulted in the death of a person. The product was recalled by the company (CDC, 2013).

In 2014, four different Listeriosis outbreaks have been reported in connection with prepackaged caramel apples, dairy products, bean sprouts and cheese. In 2014, 53 people were affected by the outbreaks, 50 people were hospitalized. Outbreaks have resulted in the death of a total of 11 people. It has been reported that the product causing the most Listeriosis cases in this year is commercially produced, prepackaged caramel apples. As a result of consumption of this product, 35 people were found to be infected with *L. monocytogenes* and 34 people were hospitalized. In addition to, 11 cases have been associated with pregnant women and newborns. It was stated that a fetus died as a result of this epidemic. All products causing the epidemic were recalled by the manufacturers (CDC 2014a, b, c, d).

In the outbreaks of 2015, two different products, soft cheese and ice cream, were found responsible for the outbreak. The total number of cases reported in 2015 is 40, and the number of hospitalizations is 38. This

epidemic in 2015 resulted in the death of six people. The products were recalled by the manufacturers (CDC 2015a, b).

Outbreaks associated with frozen vegetables, raw milk and packaged salads killed a total of 5 people in 2016. In addition to, a total of 30 people were affected by this outbreak and 30 people were hospitalized. While recall procedures are applied for frozen vegetables and packaged salads, these procedures are not applied for raw milk (CDC 2016a, b, c).

**Table 1.** Listeriosis cases, the products, hospitalizations and deaths according to the CDC reports

| Year | Products | Reported Cases | Hospitalizations | Deaths | References |
|---|---|---|---|---|---|
| **2011** | Cantaloupes | 147 | 143 | 33 | CDC, 2011 |
| **2012** | Ricotta Salata Cheese | 22 | 20 | 4 | CDC, 2012 |
| **2013** | Cheese | 6 | 6 | 1 | CDC, 2013 |
| **2014** | Prepackaged Caramel Apples | 35 | 34 | 7 | CDC, 2014a |
| | Bean Sprouts | 5 | 5 | 2 | CDC, 2014b |
| | Cheese | 5 | 4 | 1 | CDC, 2014c |
| | Dairy Products | 8 | 7 | 1 | CDC, 2014d |
| **2015** | Soft Cheeses | 30 | 28 | 3 | CDC, 2015a |
| | Ice Cream | 10 | 10 | 3 | CDC, 2015b |
| **2016** | Frozen Vegetables | 9 | 9 | 3 | CDC, 2016a |
| | Raw Milk | 2 | 2 | 1 | CDC, 2016b |
| | Packaged Salads | 19 | 19 | 1 | CDC, 2016c |
| **2017** | Vulto Creamery Soft Raw Milk Cheese | 8 | 8 | 2 | CDC, 2017 |
| **2018** | Pork Products | 4 | 4 | 0 | CDC, 2018a |
| | Deli Ham | 4 | 4 | 1 | CDC, 2018b |
| **2019** | Hard-boiled Eggs | 8 | 5 | 1 | CDC, 2019a |
| | Various foods | 24 | 22 | 2 | CDC, 2019b |
| | Deli-Sliced Meats and Cheeses | 10 | 10 | 1 | CDC, 2019c |
| **2020** | Enoki Mushroom | 36 | 30 | 4 | CDC, 2020 |

In the outbreak in 2017, 8 cases related to vulto creamery soft raw milk cheese were reported. While all of the patients were hospitalized, the outbreak resulted in the death of two people. It has been reported that the ages

of patients affected by this outbreak differ (median age 52) and five out of eight patients are women. Also, a newborn has been reported among patients. The product has been recalled (CDC 2017).

A total of 8 cases were reported in 2018. Deli ham were found responsible for these outbreaks that resulted in the death of a person. However, it is reported that there are no deaths in cases associated with pork products. The ages of patients in cases related to pork products range from 35 to 84. All four patients in this outbreak were reported to be women. However, the median age of patients in cases related to pork products is 76. All products causing the outbreaks were recalled (CDC 2018a, b).

In 2019, 42 cases related to hard-boiled eggs, deli-sliced meats, cheeses and various foods have been reported. In these outbreaks, a total of 37 people were hospitalized, while 4 people were reported dead. It has been reported that one of the deaths is linked to hard-boiled eggs, one is linked to deli-sliced meats and cheeses, and two of the deaths are linked to foods of unknown origin (CDC 2019a, b, c).

Finally, in March 2020, an outbreak related to Enoki Mushrooms has been reported. In this outbreak, 36 cases were reported in which 4 people died. In addition to, six pregnancy-related cases and two fetal losses have been reported. The products were recalled (CDC 2020b).

Between 2008 and 2015, Listeriosis outbreaks increased between the two groups of the EU population. These two groups are women between the ages of 25 and 44 and older people over 75 years old (EFSA, 2018a). In 2013, EFSA reported 1763 Listeriosis cases in 27 member countries. According to the EFSA reports, approximately 2200 people were reported to have been affected by the Listeriosis outbreaks in 2015. It was reported that 270 people died as a result of the cases. This number is the highest number of deaths reported in the European Union (EU) in connection with foodborne diseases. The rate of cases, which was 56% in 2008 for individuals over 64, increased to 64% in 2015. In addition to, the number of cases in individuals over the age of 84 doubled during the same period (EFSA, 2016). Seven foodborne outbreaks have been reported by five Member States. Foods causing Listeriosis outbreaks include seafood (3), cheese (1), meat and meat products (1), pork and its products (1), and vegetable and fruit juices and products (1) (EFSA, 2015; Buchanan et al., 2017). Cases of Listeriosis decreased from 2509 in 2016 to 2480 in 2017 (EFSA, 2018b). In addition to, Listeriosis outbreaks have been on the rise since 2008. In 2018, 2549 Listeriosis cases were reported. EFSA was reported to play a leading role in Listeriosis outbreaks of cold smoked seafood in 2019 (EFSA, 2020).

In the EU, it is stated that the maximum number of *L. monocytogenes* that can be found in a prepared food product during its shelf life is 100 CFU/g (European Commission, 2005). However, the USA has adopted the principle that the number of *L. monocytogenes* that can be found in all ready-to-eat food products should be zero (Hingston et al., 2017; Stratakos et al., 2020)

## CONCLUSION

Both CDC and EFSA reports have demonstrated the severity of Listeriosis cases. There are many measures to be taken to prevent listeriosis. It is recommended to follow good production practices, hygiene practices and effective temperature control throughout the food production, distribution and storage chain, and to cool the food below 5ºC. Additionally, the implementation of systems that will enable the detection of Listeriosis cases quickly and the recording of cases is also important for public health.

## REFERENCES

Buchanan RL, Gorris LG, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food control, 75, 1-13.

CDC, 2011. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2012. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Imported Frescolina Marte Brand Ricotta Salata Cheese. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2013. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Crave Brothers Farmstead Cheeses. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2014a. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples Made from Bidart Bros. Apples. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2014b. Wholesome Soy Products, Inc. Sprouts and Investigation of Human Listeriosis Cases. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2014c. Oasis Brands, Inc. Cheese Recalls and Investigation of Human Listeriosis Cases. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-10-14/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2014d. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Roos Foods Dairy Products. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-02-14/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2015a. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Cheeses Distributed by Karoun Dairies, Inc. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheeses-09-15/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2015b. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Blue Bell Creameries Products. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2016a. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2016b. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Raw Milk Produced by Miller's Organic Farm in Pennsylvania. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/raw-milk-03-16/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2016c. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2017. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Raw Milk Cheese Made by Vulto Creamery. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2018a. Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Pork Products. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/porkproducts-11-18/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2018b. Outbreak of Listeria Infections Linked to Deli Ham. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/countryham-10-18/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2019a. Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Hard-boiled Eggs. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/eggs-12-19/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2019b. Outbreak of *Listeria* Infections. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/monocytogenes-08-19/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2019c. Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Deli-Sliced Meats and Cheeses. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/deliproducts-04-19/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2020a. *Listeria* (Listeriosis). Available at: https://www.cdc.gov/listeria/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2020b. Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Enoki Mushrooms. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html (Accessed 31 March 2020).

CDC, 2020c. *Listeria* Outbreaks. Available at: https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html (Accessed 31 March 2020).

Cossart P and Lebreton A 2014. A trip in the "New Microbiology" with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. FEBS letters, 588(15), 2437-2445.

Desai AN, Anyoha A, Madoff LC, Lassmann B 2019. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. International Journal of Infectious Diseases, 84, 48-53.

EFSA 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal, 13(1), 3991.

EFSA 2016. Zoonoses report: *Listeria* infections stable but frequently reported among the elderly. Available at: https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/161216 (Accessed 31 March 2020).

EFSA 2018a. *Listeria* infections increase in vulnerable groups. Available at: https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180124 (Accessed 31 March 2020).

EFSA 2018b. Zoonotic diseases: progress has stalled. Available at: https://www.efsa.europa.eu/en/news/zoonotic-diseases-progress-has-stalled (Accessed 31 March 2020).

EFSA 2020. *Listeria*. Available at: https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria (Accessed 31 March 2020).

European Commission (EC) 2005. Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union, L338.

Gu Y, Liang X, Huang Z, Yang Y 2015. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in pheasants. Poultry science, 94(12), 2905-2908.

Hingston P, Chen J, Dhillon BK, Laing C, Bertelli C, Gannon, V, et al 2017. Genotypes associated with *Listeria monocytogenes* isolates displaying impaired or enhanced tolerances to cold, salt, acid, or desiccation stress. Frontiers in microbiology, 8, 369.

Lassen SG, Ethelberg S, Björkman JT, Jensen T, Sørensen G, Jensen AK, et al 2016. Two *Listeria* outbreaks caused by smoked fish consumption-using whole-genome sequencing for outbreak investigations. Clinical Microbiology and Infection, 22(7), 620-624.

Nichols M, Conrad A, Whitlock L, Stroika S, Strain E, Weltman A, et al 2020. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections retrospectively linked to unpasteurized milk using whole-genome sequencing. Journal of dairy science, 103(1), 176-178.

Okpo E, Leith J, Smith-Palmer A, Bell J, Parks D, Browning F, et al 2015. An outbreak of an unusual strain of *Listeria monocytogenes* infection in North-East Scotland. Journal of infection and public health, 8(6), 612-618.

Stratakos AC, Ijaz UZ, Ward P, Linton M, Kelly C, Pinkerton L, et al 2020. In vitro and in vivo characterisation of *Listeria monocytogenes* outbreak isolates. Food Control, 107, 106784.

Zhu Q, Gooneratne R, Hussain MA 2017. *Listeria monocytogenes* in fresh produce: outbreaks, prevalence and contamination levels. Foods, 6(3), 21.

## Çeşitli Jojoba Yaprak Ekstrelerinin Güneşten Koruma Potansiyelinin Belirlenmesi

Meltem Aşan-Özüsağlam*, Songül Tacer, Gülden Koç, Fatma Hilal Demir

Aksaray Üniversitesi, Fen edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü, Aksaray, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: meltemozusaglam@gmail.com

### Özet

UV radyasyonuna uzun süre maruz kalmak, kanser, iltihaplanma (eritem veya güneş yanığı), pigmentasyon, hiperplazi, immünosüpresyon ve kutanöz fotoyaşlanma gibi hastalıkların riskini artırır. Güneşin bu zararlı etkilerine karşı korunmak için kullanılan kimyasal güneş koruyucularının bazı toksik etkileri nedeniyle, bitki içerikli doğal güneş koruyuculara ilgi artmaktadır. Ekonomik ve tıbbi değeri yüksek olan Jojoba (*Simmondsia chinensis*) son yıllarda Türkiye'de de yetiştirilmektedir. Jojoba yağı güneş koruyucu kremlerin içeriğinde kullanılabilmektedir. Çalışmada, Jojoba yaprağı ekstrelerinin güneşten korunma faktörleri in vitro olarak incelenmiştir. Soksilet sistemi kullanılarak çeşitli ektsreler (etanol, metanol, aseton ve hekzan) hazırlanmıştır. Ektrelerin güneşten koruma faktörleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Güneşten korunma faktörü, etanol ekstresi için 30.449 ve metanol ekstresi için 28.669 olarak bulunmuştur. Aseton ve hekzan ekstreleri, 29.522 ve 16.086 güneşten korunma faktörlerini göstermiştir. Test edilen Jojoba yaprak ekstreleri arasında güneşten korunma faktörü sıralaması etanol > aseton > metanol > hekzan olarak belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Jojoba yaprak ekstrelerinin, yağına alternatif olarak kozmetik ve farmasötik preparatlarda güneşten koruyucu olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Jojoba yaprak ekstreleri, günümüzde sanayide kullanılan zararlı yan etkilere sahip olabilen kimyasal güneş kremlerine ucuz ve güvenli bir alternatif olabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Simmondsia chinensis*, ekstre, güneşten koruma faktörü

## Determination of Solar Protection Potential of Various Leaf Extracts from Jojoba

### Abstract

Prolonged exposure to UV radiation increases the risk of diseases such as cancer, inflammation (erythema or sunburn), pigmentation, hyperplasia, immunosuppression and cutaneous photoaging. Due to some toxic effects of chemical sunscreens used to protect against these harmful effects of sun, there is increasing interest in natural sunscreen with plant content. Jojoba (*Simmondsia chinensis*) with high economic and medicinal value is also grown in Turkey in recent years. The oil of Jojoba can be used in the sunscreen creams content. In the study, sun protection factors of Jojoba leaves extracts were investigated in vitro. Various extracts (ethanol, methanol, acetone and hexane) were prepared using ***soxhlet*** apparatus. The sun protection factors of the extracts were determined spectrophotometrically. The sun protection factor was found to be 30.449 for ethanol extract and 28.669 for methanol extract. The acetone and hexane extracts showed 29.522 and 16.086 of sun protection factors. Among the Jojoba leaves extracts tested, the sun protection factor ranking was determined as ethanol > acetone > methanol > hexane. The results from the presented study indicated that the leave extracts of Jojoba alternate to its oil could be using as sunscreen in cosmetic and pharmaceutical preparations. Extracts from Jojoba leaves can be a cheap and safe alternative to chemical sunscreens that can have harmful side effects used in industry today.

**Keywords:** *Simmondsia chinensis*, extract, sun protection factor

## GİRİŞ

Jojoba (*Simmondsia chinensis*) herdem yeşil bir bitki olup anavatanı Amerika ve Meksika'dır (Dunstone and Begg, 1983). Günümüzde yüksek ekonomik ve tıbbi değerinden dolayı Türkiye'de de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde Akdeniz ve Ege bölgelerinin sahil kesimlerinde Jojoba rahatlıkla yetişebilmektedir (Ayanoğlu ve Ayanoğlu, 1995). Jojoba yaprak ekstrelerinin antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktiviteleri olduğu literatürde bildirilmektedir (Al-Qizwini ve ark., 2014; Abdel-Mageed ve ark., 2014; Aşan-Özüsağlam ve ark., 2018).

Ultraviyole radyasyon (UVR) ultraviyole A (UV-A, 315-400 nm), ultraviyole B (UV-B, 280-315 nm) ve ultraviyole C (UV-C, 100-280 nm) olmak üzere üç ayrı bölgeye ayrılır (Polonini ve ark., 2011). Cilde toplam etkiyle ulaşan UVR, morfolojik ve kimyasal reaksiyonlarla ilişkili karmaşık bir sürece neden olur. DNA, UVR'yi absorbe eden önemli bir makromolekülüdür. İlerleyen zamanlarda UVR mutasyona neden olabilmekte ve cilt kanserlerine yol açabilmektedir (Balogh ve ark., 2011). Çoğu cilt kanseri, yüz, boyun ve ellerin arkası gibi güneşe en sık maruz kalan bölgelerde ortaya çıkmaktadır (Mehta ve ark., 2006). Ayrıca iltihaplanma (eritem veya güneş yanığı), pigmentasyon, hiperplazi, immünosüpresyon ve kutanöz fotoyaşlanma gibi hasarlara da neden olur (Chrétien ve ark., 2010; Hupel ve ark., 2011). UVR'ye karşı etkili koruma güneş koruyucuları ile sağlanmakta olup etkinlikleri radyant enerjiyi emme kapasitelerine bağlıdır. Bir güneş koruyucusunun etkinliği, güneş koruma faktörlerinin (SPF) bir fonksiyonu olarak ölçülür (Vilela ve ark., 2011).

Güneşten koruyucular, güneşin etkilerine karşı koruma sağlayan ürünler olmakla birlikte insanların sık maruz kalmaları nedeniyle olumsuz etkilere de neden olabilmektedirler. Bu nedenle son yıllarda UV ışınlarının zararlı etkilerine karşı koruma sağlayan bitkisel içerikli ürünlere ilgi artmaktadır. Bitkisel ekstrelerin ve doğal moleküllerin güneşten korunma alanında kullanılması kozmetik endüstrisinde yeni bir eğilim meydana getirmektedir (Buso ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda bitkisel doğal ürünlerin, UV filtreleme ve antioksidan aktiviteleri ve DNA koruyucu etkilerden dolayı foto koruma aktivitesi gösterdiği bildirilmektedir (Baker ve ark., 2017; Radice ve ark., 2016; Cefali ve ark., 2016). Potansiyel olarak kimyasal içerikli güneşten koruyucularla karşılaştırıldığında bitkisel içerikli doğal güneş koruyucuları daha az yan etki oluşturmakta ve doğal ürünler kullanmak isteyen hastalar için de alternatif oluşturabilmektedirler (Rabinovich ve Kazlouskaya, 2018). Literatürde, bitkisel içerikli güneş kremlerinde Jojoba yağı kullanıldığı bildirilmektedir (Ayanoğlu, 2001). Bu çalışmada ise, Jojoba yapraklarından elde edilen çeşitli ekstrelerin (etanol, metanol, aseton ve hekzan) güneşten koruma faktörleri belirlenerek kozmetik sanayinde kullanım potansiyelinin ortaya çıkarılması amaçlamıştır.

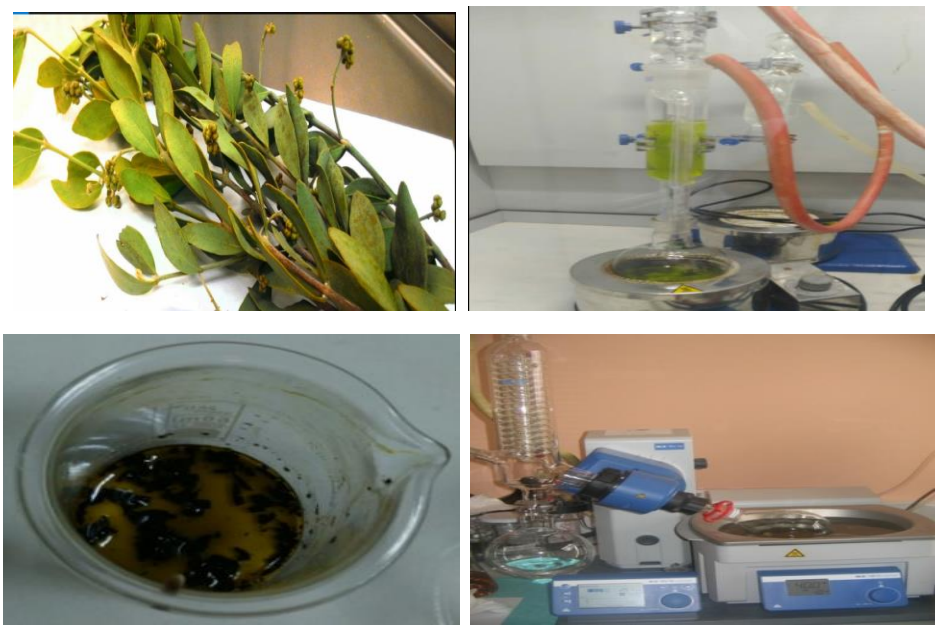
## MATERYAL VE METOT

### Ekstrelerin Hazırlanması

Jojoba bitkisinin yaprakları Mersin Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Jojoba yaprakları kurutulup öğütüldükten sonra soksilet ile farklı çözücülerde (etanol, metanol, aseton, hekzan) ekstrakte edilmiş ve ardından yaprak ekstreleri Whatman filitre kağıdı ile süzülerek kaba partiküller uzaklaştırılmıştır. Yaprak ekstrelerinin çözücüleri rotary evaporatör ile buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır (Şekil 1).

### Ektrelerin Güneşten Koruma Faktörlerinin Belirlenmesi

Ekstrelerin güneşten koruma faktörlerinin in vitro olarak belirlenmesi için ekstreler ayrı ayrı etanol içinde 2 mg/ml konsantrasyonunda üç tekerrür olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler 290 nm'den 320 nm'ye kadar 5 nm aralıklarla spektrofotometrede (Beckman Coulter) okunmuştur (Mansur ve ark., 1986). Güneşten koruma faktörünü hesaplamak için Mansur denklemi kullanılmıştır.



**Şekil 1.** Jojoba yaprak ekstrelerinin hazırlanması

$$\textbf{Güneşten koruma faktörü (SPF) spektrofotometrik} = \textbf{CF x } \sum_{290}^{320} \boldsymbol{EE(\lambda)} \text{x } \boldsymbol{I(\lambda)} \text{x } \boldsymbol{Abs\ (\lambda)}$$

**CF** = Düzeltme faktörü (= 10); **EE (λ)** = Eritemetojenik etki radyasyon dalgaboyu (λ);

**I (λ)** = Güneş ışığının dalga boyundaki yoğunluğu (λ);**abs (λ)** = Ekstrelerin dalga boyundaki absorbansı (λ).

EE (λ) ve I (λ) değerleri daha önceden Sayre ve ark. (1979) tarafından hesaplanmış olup veriler Tablo 1'de sunulmuştur.

**Table 1**.Herbir dalgaboyundaki radyasyon şiddeti ve eritemetojenik etki arasındaki ilişki

| **λ (nm)** | **EE (λ)x I(λ)** |
|---|---|
| 290 | 0.0150 |
| 295 | 0.0817 |
| 300 | 0.2874 |
| 305 | 0.3278 |
| 310 | 0.1864 |
| 315 | 0.0839 |
| 320 | 0.0180 |
| **Toplam** | **1.0000** |

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Jojoba yaprakları kurutulup öğütüldükten sonra soksilet sistemi kullanılarak farklı çözücülerde (etanol, metanol, aseton, hekzan) ekstrakte edilmiş ve sonrasında çözücüleri buharlaştırılarak ham ekstre elde edilmiştir. Elde edilen değişik ekstrelerin güneş koruma faktörleri Mansur ve ark.(1986)'na göre hesaplanmış ve Tablo 2-5'de sunulmuştur. Toplam güneşten koruma faktörü etanol ekstresi için 30.449 bulunurken metanol ekstresi için 28.669 olarak belirlenmiştir. Aseton ve hekzan ekstreleri için güneşten koruma faktörleri 29.522

ve 16.086 olarak tespit edilmiştir. Test edilen Jojoba ekstreleri arasında güneşten koruma faktörü sıralaması etanol>aseton>metanol>hekzan olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 2.** Jojoba yaprak etanol ekstresi güneşten koruma faktörü

| **λ (nm)** | **EE (λ)x I(λ)** | **Jojoba Yaprak Etanol Ekstresi** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **Güneşten Koruma Faktörü (Tekerrür)** | | | |
| | | **1** | **2** | **3** | |
| 290 | 0.0150 | 0.463 | 0.467 | 0.465 | |
| 295 | 0.0817 | 2.498 | 2.541 | 2.529 | |
| 300 | 0.2874 | 8.777 | 8.863 | 8.829 | |
| 305 | 0.3278 | 9.857 | 9.926 | 9.965 | |
| 310 | 0.1864 | 5.588 | 5.687 | 5.695 | |
| 315 | 0.0839 | 2.483 | 2.518 | 2.560 | |
| 320 | 0.0180 | 0.545 | 0.540 | 0.552 | **Ortalama±Standart Sapma** |
| **Toplam** | **1.0000** | **30.212** | **30.541** | **30.595** | **30.449±0.207** |

**Tablo 3.** Jojoba yaprak metanol ekstresi güneşten koruma faktörü

| **λ (nm)** | **EE (λ)x I(λ)** | **Jojoba Yaprak Etanol Ekstresi** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **Güneşten Koruma Faktörü (Tekerrür)** | | | |
| | | **1** | **2** | **3** | |
| 290 | 0.0150 | 0.457 | 0.457 | 0.460 | |
| 295 | 0.0817 | 2.368 | 2.429 | 2.447 | |
| 300 | 0.2874 | 8.122 | 8.317 | 8.470 | |
| 305 | 0.3278 | 9.110 | 9.349 | 9.559 | |
| 310 | 0.1864 | 5.163 | 5.290 | 5.396 | |
| 315 | 0.0839 | 2.307 | 2.355 | 2.412 | |
| 320 | 0.0180 | 0.502 | 0.515 | 0.523 | **Ortalama±Standart Sapma** |
| **Toplam** | **1.0000** | **28.028** | **28.713** | **29.266** | **28.669±0.620** |

**Tablo 4.** Jojoba yaprak aseton ekstresi güneşten koruma faktörü

| λ (nm) | EE (λ)x I(λ) | Jojoba Yaprak Etanol Ekstresi Güneşten Koruma Faktörü (Tekerrür) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | |
| 290 | 0.0150 | 0.425 | 0.457 | 0.471 | |
| 295 | 0.0817 | 2.388 | 2.423 | 2.554 | |
| 300 | 0.2874 | 8.320 | 8.478 | 8.912 | |
| 305 | 0.3278 | 9.290 | 9.536 | 10.018 | |
| 310 | 0.1864 | 5.316 | 5.372 | 5.693 | |
| 315 | 0.0839 | 2.378 | 2.422 | 2.526 | |
| 320 | 0.0180 | 0.509 | 0.531 | 0.548 | **Ortalama±Standart Sapma** |
| **Toplam** | **1.0000** | **28.627** | **29.219** | **30.772** | **29.522±1.080** |

**Tablo 5.** Jojoba yaprak hekzan ekstresi güneşten koruma faktörü

| λ (nm) | EE (λ)x I(λ) | Jojoba Yaprak Etanol Ekstresi Güneşten Koruma Faktörü (Tekerrür) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | |
| 290 | 0.0150 | 0.237 | 0.453 | 0.399 | |
| 295 | 0.0817 | 1.209 | 1.288 | 2.085 | |
| 300 | 0.2874 | 4.118 | 4.437 | 7.171 | |
| 305 | 0.3278 | 4.432 | 4.717 | 4.960 | |
| 310 | 0.1864 | 2.416 | 2.598 | 2.941 | |
| 315 | 0.0839 | 1.052 | 1.134 | 1.938 | |
| 320 | 0.0180 | 0.214 | 0.247 | 0.411 | **Ortalama±Standart Sapma** |
| **Toplam** | **1.0000** | **13.678** | **14.675** | **19.906** | **16.086±3.345** |

Bitki ekstreleriyle yapılan bir çalışmada, *Carica papaya* meyve etanol:su (1:1) ekstresinin güneş koruma faktörü 16.047 olarak belirlenmiştir (Shenekar ve ark., 2014). Yapılan başka bir çalışmada ise *Marcetia taxifolia* yaprak etanol ekstresinin değişik konsantrasyonlarının (250 ve 125 µg/µl) 15.52 ve 8.35 güneş koruma aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Costa ve ark., 2015).

UV enerjisinin fotonlar tarafından absorbe edilmesi ve daha az zararlı enerji salınımı bir bitkinin foto-koruma olarak işlev görebileceği çeşitli mekanizmalardan biridir. Bitkisel ekstreler, görünür ışığı ve farklı uzunluklardaki UV ışığını emebilen moleküllerin bir karışımını sunar (Radice ve ark., 2016). Polifenolik maddelerin, flavonların, flavonoidlerin, tanenlerin ve bitkilerden gelen lipit fraksiyonlarının görünür ışığı ve UVB'yi absorbe edebileceği literatürde bildirilmiştir (Maini ve ark., 2015).

## SONUÇ

Bu çalışma, çeşitli Jojoba yaprak ekstrelerinin güneşten koruma etkinliğini ve güneş koruyucu formülasyonlarında kullanılma potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Günümüzde endüstride kullanılan kimyasal içerikli zararlı yan etkilere sahip olabilen güneş kremlerine Jojoba yaprağı ekstreleri, daha ucuz ve güvenli bir alternatif olabilecektir.

## KAYNAKLAR

Abdel-Mageed WM, Bayoumi SALH, Salama AAR, Salem-Bekhit MM, Abd-Alrahman SH, Ala-Qizwini H, Ekbal AK, Mhaidat NM, Maraqa A 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of jordanian Simmondsia chinensis (link) ck schneid. European Scientific Journal, 10: 229–241.

Asan-Ozusaglam M, Yavuz A, Tacer S 2018. Antimicrobial potential of jojoba leaf extracts as food preservatives. 3rd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2018), s.112 Paper ID:38

Ayanoğlu F, Ayanoğlu H 1995. Jojoba bitkisinin (*Simmondsia chinensis* link. schneider) Erdemli koşullarında adaptasyonunda ilk sonuçlar. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 650-654.

Ayanoğlu F 2001. Jojoba (*Simmondsia chinensis* Link. Schneider) ve Türkiye'de yetiştirilebilme olanakları III. Jojoba yağı, kullanım alanları ve ekonomik önemi. Anadolu, 11(1): 103 – 112.

Balogh TS, Velasco MVR, Pedrial CA, Kaneko TM 2011. Protec¸ ão à radiac¸ ãoultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoprotec¸ ão. ***Anais Brasileiros de Dermatologia***, 86: 732–742.

Baker LA, Marchetti B, Karsili TNV, Stavros VG, Ashfold MNR 2017. Photoprotection: Extending lessons learned from studying natural sunscreens to the design of artificial sunscreen constituents. Chemical Society Reviews, 46:3770-3791. DOI: 10.1039/c7cs00102a.

Buso P, Radice M, Baldisserotto A, Manfredini S, Vertuani S 2017. Guidelines for the development of herbal-based sunscreen. In Herbal Medicine, Chapter 4, pp 43-58. http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72712.

Cefali LC, Ataide JA, Moriel P, Foglio MA, Mazzola PG 2016. Plant compounds as active photo protectants in sunscreens. International Journal of Cosmetic Science, 38:346-353. DOI: 10.1111/ics.12316

Chrétien MN, Heafey E, Scaiano JC 2010. Reducing adverse effects from UV sunscreens by zeolite encapsulation: comparison of oxybenzone in solution and in zeolites. Photochemistry and Photobiology, 86:153–161.

Costa SCC., Detoni CB, Branco CRC, Botura M B, Branco A 2015. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. Revista Brasileira de Farmacognosia, 25: 413–418.

Dunstone RL, Begg JE 1983. A potential crop for Australia. The Aust. Inst. Agric. Sci., 49:51-59.

Hupel M, Poupart N, Ar Gall E 2011. Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. Talanta, 86: 362–371.

Maini S, Fahlman BM, Krol ES 2015. Flavonols protect against UV radiationinducedthymine dimer formation in an artificial skin mimic. Journal of Pharmaceutical Sciences,18: 600-615.

Mansur JS., Breder MNR., Mansur MCA, Azulay RD 1986. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. An. Bras. Dermatol., Rio de Janeiro, 61: 121-124.

Mehta P, Chand K, Narayanswamy D, Beetner DG, Zoughi R, Stoecker WV 2006. Microwave reflectometry as a novel diagnostic tool for detection of skin cancers. IEEE Trans. On Instrumentation and Measurement, 55(4): 1309–1316,

Polonini HC, Raposo NRB, Brandão MA 2011. Fotoprotetores naturais no con-texto da saúde pública brasileira. Revista de APS, 14: 216–233.

Rabinovich L, Kazlouskaya V 2018.Herbal sun protection agents: Human studies. Clinics in Dermatology, 36: 369–375.

Radice M, Manfredini S, Ziosi P, Dissette V, Buso P, Fallacara A, Vertuani S 2016. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. Fitoterapia, 114:144-162. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.09.003

Sayed HM 2014. Antioxidant lipoxygenase inhibitors from the leaf extracts of *Simmondsia chinensis*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 7: 521–526.

Sayre RM, Agin PP,Levee GJ, Marlowe E 1979. Comparison of *in vivo* and in vitro testing of sunscreening formulas. Photochemistry and Photobiology, 29: 559-566.

Shenekar PN, Ukirade PS, Salunkhe SD, Sutar ST, Magdum CS, Mohite SK, Lokapure SG, Metri SM 2014. In vitro evaluation of sun protection factor of fruit extract of *Carica papaya L.* as a lotion formulation. European Journal of Experimental Biology, 4(2): 44-47.

Vilela FMP, Fonseca YM, Vicentini FT, Fonseca MJV, Amaral MD 2011. Determination of three ultraviolet filters in sunscreen formulations and from skin penetration studies by high-performance liquid chromatography. Quimica Nova, 34: 879–883.

# Kamkat (*Fortunella margarita*) Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin Antibakteriyel Aktivitesi

Meltem Aşan-Özüsağlam*, Gülden Koç, Fatma Hilal Demir

Aksaray Üniversitesi, Fen edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü, Aksaray, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: meltemozusaglam@gmail.com

## Özet

Günümüzde antibiyotik kullanımının artışı ve mikroorganizmaların kullanılan antibiyotiklere kazanabileceği dirençlerden dolayı doğal antimikrobiyal kaynakların önemi artmaktadır. Kamkat meyve ve yaprakları geleneksel tedavide kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'den toplanan Kamkat meyve ve yaprağının metanolik ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi, insan gıda ve klinik test mikroorganizmaları (*Bacillus cereus* RSKK 863, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Mıcrococcus luteus* NRRL B-4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterolitica* ATCC 11175) üzerinde araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca ekstrelerin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerleri de tespit edilmiştir. Disk difüzyon sonuçlarına göre, en yüksek inhibisyon zon çapı kamkat meyve metanol ekstresinde *S. aureus* ATCC 25923'e karşı 16.09 mm olarak kaydedilmiştir. Ekstrelerin MİK değerleri 6.25-100 mg/mLve MBC değerleri 6.25-200 mg/mL olarak belirlenmiştir. En düşük MİK ve MBC değerleri (6.25 mg/mL) *Yersinia enterolitica* ATCC 11175'e karşı metanol yaprak ekstresinde belirlenmiştir. Elde edilen veriler, kamkat meyve ve yaprak ekstrelerinin doğal antimikrobiyal madde katkıları olarak gıda ve ilaç sanayilerinde kullanım potansiyeli taşıyabileceğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kamkat, antibakteriyel aktivite, ekstre, metanol

## Antibacterial Activity of Fruit and Leaf Extracts from Kumquat (*Fortunella margarita*)

## Abstract

Today, the importance of natural antimicrobial sources is increasing due to the increase in antibiotic usage and resistance of microorganisms to the antibiotics used. Kumquat fruits and leaves are used in traditional remedy. In this study, antibacterial activity of methanolic extract from kumquat fruit and leaves from Turkey against human food-borne and clinical test microorganisms (*Bacillus cereus* RSKK 863, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterolitica* ATCC 11175) was investigated. Disc diffusion method was used to determine antimicrobial activity. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts were also assayed. According to disc diffusion results, the highest inhibition zone diameter was recorded as 16.09 mm against *S. aureus* ATCC 25923 in kumquat fruit methanol extract. MIC and MBC values of the extracts were determined as 6.25-100 mg/mL and 6.25-200 mg/mL. The lowest MIC and MBC values (6.25 mg/mL) against *Yersinia enterolitica* ATCC 111752 was determined from methanol leaf extract. The data obtained showed that kumquat fruit and leaf extracts may have potential for use in food and pharmaceutical industries as natural antimicrobial additives.

**Key words:** Kumquat, antibacterial activity, extract, methanol

## GİRİŞ

Ticari olarak üretilen antibiyotiklerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Artan antibiyotik kullanımın zararlı etkilerinin farkına varılmasıyla oluşan zararlı etkilerin önüne geçmek amacıyla bitkilerin antimikrobiyal aktivitesinden yararlanma fikri önem kazanmıştır. Bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Günümüzde ise alternatif tıp başlığı altında bazı ülkelerde bitkilerin tedavi amaçlı kullanım eğilimi artmaktadır. Ülkemizin bulunduğu coğrafi konum nedeniyle zengin bir bitki florasına sahiptir. Kamkat (*Fortunella margarita*) Rutacaea familyasına ait bir narenciye türüdür. Turuncu-sarı bir renge sahip olan kamkat meyvesinin anavatanı Çin'dir. Japonya ve Tayvan'da üretimine başlanan Kamkat, 1625'lerin başında Hawaii'de, 1825'ten sonra Avrupa'da tanınmış ve üretilmeye başlanmıştır (Peng ve ark., 2013; Love ve ark., 2017). Ülkemizin içerdiği zengin iklim çeşidi nedeniyle, kamkat meyvesi Rize ve Antalya taraflarında üretilebilmektedir. Subtropikal bir ağaç olan Kamkat, herdemyeşil ve çalı şeklinde olan ağaçtır (Güney ve ark.,

2015). Sulak alanlarda yetiştirildiğinde meyve veriminin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Güney ve ark., 2015). Tüm narenciye çeşitlerinin aksine, bu meyve kabukla tüketilebilir. Ekşi bir meyve tadı olmasına rağmen, flavonoid ve terpenoidlerin varlığı nedeniyle kabuğu tatlıdır (Olcay ve ark., 2019). Kamkat meyvesinin günümüzde pek çok kullanım alanı vardır. Gıda endüstrisinde şeker şurubu şeklinde kullanımı yaygın iken, taze olarak meyve salataları ve içeceklere eklenebilir, şeker, marmelat, şarap, likör, turşu ve sos gibi ürünlere de işlenebilmektedir (Sadek ve ark., 2009; Barreca ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012; Peng ve ark., 2013). Tayvan'da ise çay olarak tüketimi tercih edilmektedir. İçerdiği yüksek oranda $B_{12}$ vitami sayesinde bağışlık sistemini güçlendirirken aynı zamanda da antioksidan ve antimikrobiyal etki de göstermektedir. Kamkat yağı alerjilere, damar sertliğine, kılcal kırılganlık, kanser ve enflamatuar hastalıklara karşı terapötik etki gösterdiği de araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Güney ve ark., 2015). Bazı ülkelerde özellikle kışları meyve çayı olarak tüketilmekte ve öksürük/soğuk algınlığı tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca kamkat türleri yine geleneksel olarak ateş, safra kesesi taşı, sindirim bozuklukları, fıtık ağrısı, karın ağrısı, hepatit, yüksek tansiyon, rahim yada anüste sarkma, astım gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Scordino ve ark.,2011; Nalbantbaşı ve Gölcü, 2009). Günümüzde sentez yoluyla üretilen ilaçların yan etkilerinin fazla olması ve antimikrobiyal ilaçlara kazanılan direnç modern tıbbın hastalıkları tedavi etmekte yetersiz kaldığını ortaya çıkarmaktadır (Nalbantbaşı ve Gölcü, 2009). Bu nedenle çalışmamızda, kamkat meyve ve yaprak ekstrelerinin klinik ve gıda test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel aktivitesi belirlemek ve bu ekstrelerin gıda ve ilaç sanayilerinde doğal antimikrobiyal madde katkıları olarak kullanım potansiyelini tespit etmek amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Meyve ve Yaprak Örneklerinin Temini

Kamkat yaprak ve meyveleri Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'den temin edilmiştir.

### Ekstrelerin Hazırlanması

Kamkat meyve ve yaprakları yıkanıp kurutulmuş (Şekil 1) ve Waring blendır ile öğütülmüştür. Öğütülen meyve ve yaprak örnekleri soksilet sistemi ile metanol ile ekstrakte edilmiştir (Şekil 2A). Çözücüler rotary evaporatör kullanılarak uçurulmuş ve kuru ekstre elde edilmiştir (Şekil 2B). Kamkat meyve - yaprak ekstreleri metanolde çözülmüş ve 0.45µm'lik filtre ile steril edilmiştir.



**Şekil 1.** Kamkat meyve ve yaprakları




**Şekil 2**. Kamkat meyve ve yaprak ekstrelerinin hazırlanması

**A.** Kamkat meyve ve yaprak esktrelerinin soksilet sistemi ile hazırlanması

**B.** Çözücüleri buharlaştırılmış kamkat meyve ve yaprak ekstreleri

**Test Mikroorganizmaları**

İnsan gıda ve klinik kökenli test mikroorganizmalarının (*Bacillus cereus* RSKK 863, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterolitica* ATCC 11175) 24 saatlik aktif kültürleri kullanılmıştır.

**Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi**

***Disk difüzyon yöntemi***

Kamkat meyve ve yaprağının metanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla disk difizyon yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan 5 adet insan orijinli test mikroorganizmaları Nutrient Broth (NB) besi yerlerinde kültürleri yapılmış ve 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Test mikroorganizmaları, serum fizyolojik ile iki defa yıkandıktan sonra konsantrasyonları 0.5 McFarland'a ayarlanmış ve katı besi yerlerine inoküle edilmiştir. Ekimi yapılan petrilere steril diskler yerleştirildikten sonra disklere kamkat meyve ve yaprak ekstreleri (20 µL) damlatılmıştır. Petriler 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafındaki zonlar ölçülerek kaydedilmiştir. Tüm deneyler iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

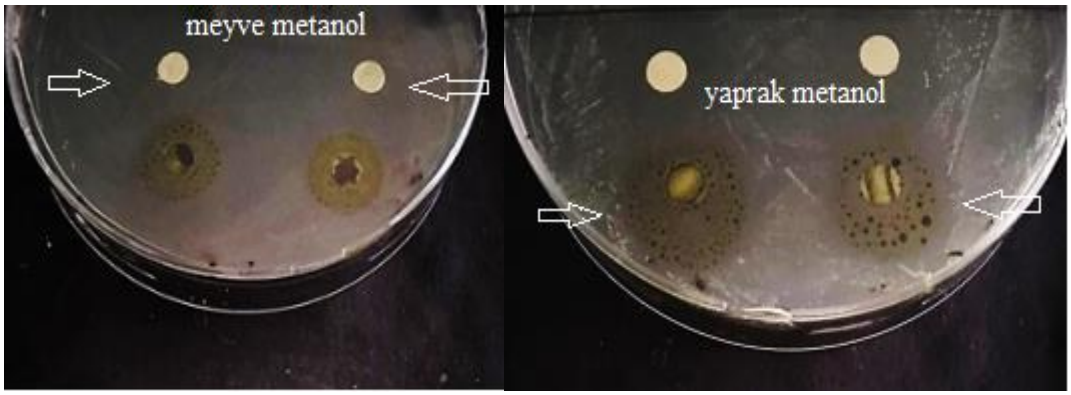
***Minimal inhibisyon (MİK) ve bakterisidal (MBC) konsantrasyonlarının belirlenmesi***

Ekstrelerin MİK ve MBC değerleri insan test mikroorganizmalarına karşı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstre ve besi yeri içeren her tüpe 0.5 McFarland'a ayarlanmış test mikroorganizmaları eklenmiş ve vorteks yapılmıştır. Daha sonra karışımı içeren tüpler 24 saat 37°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, sıvı besi yerinde gelişmenin olmadığı konsantrasyon MİK değerleri olarak kaydedilmiştir. Tüplerden örnekler alınarak spesifik agar besi yerine spot ekimleri yapılmış ve 24 saat 37°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, katı besi ortamı üzerinde bakterilerin gelişimini önleyen ekstre konsantrasyonları MBC değerleri olarak değerlendirilmiştir.

**BULGULAR VE TARTIŞMA**

Kamkat meyvesinin ve yaprağının metanolik ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstrelerin ayrıca MİK ve MBC değerleri de tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde gıda (*B. cereus* RSKK 863, *M. luteus* NRRL B-4375, *S. aureus* ATCC 25923, *Y. enterolitica* ATCC 11175) ve klinik (*E. coli* ATCC 11229) test mikroorganizmaları kullanılmıştır. Gelişmiş ülkelerde yasayan insanların yaklaşık %30'u gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalardan zarar görebilmektedir (Sağdıç ve ark., 2005). Disk difüzyon sonuçlarına göre, en yüksek antimikrobiyal aktivite kamkat meyve metanol

ekstresinde 16.06 mm ile *S. aureus* ATCC 25923'e karşı tespit edilmiştir (Şekil 3A). Meyve metanol ekstresinde, *S. aureus* ATCC 2592'den sonra en yüksek inhibisyon zonu *B. cereus* RSKK 863'de (15.58 mm) belirlenmiştir. Yaprak metanol eksterisinde ise en yüksek inhibisyon zon çapı 15.88 mm ile *E. coli* ATCC 11229'a karşı tespit edilmiştir (Şekil 3B). Ekstrelerin inhibisyon zon çapları ile kanamisin antibiyotiğinin (30 µg) oluşturduğu zon çapları yakın değerler olarak tespit edilmiştir.




**Şekil 3.** Kamkat meyve ve yaprak ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi

**(A)** meyve metanol ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923 üzerindeki aktivitesi

**(B)** yaprak metanol ekstresinin *E. coli* ATCC 11229 üzerindeki aktivitesi

Kamkat meyve ve yaprak metanol ekstrelerinin MİK ve MBC değerleri 6.25-100 mg/mL ve 6.25-200 mg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 1, Şekil 4). En düşük MİK ve MBC değerleri (6.25 mg/mL) *Y. enterolitica* ATCC 11175'e karşı metanol yaprak ekstresinde belirlenmiştir. Saman ve ark. (2019) yaptığı bir çalışmada kamkat (*Citrus japonica* Thunb) meyve kabuğunu %80'lik metanol içerisinde ekstrakte etmişlerdir. Ekstrenin, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *S. aureus*'un inhibisyon zon çapı ve MİK değerleri 20.03 mm ve 315 µg/mL olarak belirlenmiştir. *E. coli* için inhibisyon zon çapı ve MİK değerleri ise 13.07 mm ve 625 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Aşan-Özüsağlam ve Günyaktı (2015)'nın yaptığı bir başka çalışmada ise kamkat meyve ve yaprak metanol ekstrelerinin *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida glabrata* RSKK 04019'a kaşı antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmalarında, meyve ve yaprak metanol ekstrelerinin *C. glabrata* RSKK 04019'a karşı inhibisyon zon çapı 9.40 mm ve 8.28 mm ve MFC değerleri 25 mg/mL ve 100 mg/mL olarak belirlemişlerdir. *C. albicans* ATCC 10231'a karşı meyve ve yaprak metanol ekstrelerinin inhibisyon zon çapı 8.63 mm ve 8.04 mm, MFC değerleri ise her iki ekstre için 25 mg/mL olarak tespit edilmiştir.




**Şekil 4.** Kamkat meyve ve yaprak metanol ekstrelerinin *S. aureus* RSKK 863'e karşı MBC değerlerinin belirlenmesi

**Tablo 1**. Kamkat meyve ve yaprak metanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi

| Test mikroorganizmaları | İnhibisyon zon çapı (mm) | | MIC (mg/mL) | | MBC (mg/mL) | | Antibiyotik inhibisyon zon çapı (mm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Meyve | Yaprak | Meyve | Yaprak | Meyve | Yaprak | Kanamisin (30 µg) |
| ***B.cereus*** **RSKK 863** | 15.58 ±1.26 | 14.75 ±0.87 | 50 | 25 | 100 | 100 | 20.13 ±0.64 |
| ***E. coli*** **ATCC 11229** | 15.05 ±0.72 | 15.88 ±0.42 | 25 | 100 | 100 | 200 | 19.51 ±0.24 |
| ***M. luteus*** **NRLL B-4375** | 13.91 ±0.51 | 14.95 ±0.77 | 50 | 25 | 100 | 100 | 15.85 ±0.97 |
| ***S. aureus*** **ATCC 25923** | 16.09 ±0.70 | 14.26 ±0.72 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 16.16 ±2.41 |
| ***Y. enterolitica*** **ATCC 11175** | 13.49 ±0.01 | 13.21 ±1.11 | 12.5 | 6.25 | 12.5 | 6.25 | 14.84 ±0.43 |

## SONUÇ

Kamkat meyve ve yaprak metanol ekstrelerinin test edilen gıda ve klinik kökenli insan test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, bu ekstrelerin gıda ve ilaç sanayinde doğal antimikrobiyal madde katkısı olarak kullanım potansiyelinin olabileceğini göstermiştir. Kamkat bitkisinin herdem yeşil olması, üretiminin ucuz ve kolay yapılabilmesi bu bitkinin ekonomik olarak önemini artırmaktadır.

## KAYNAKLAR

Barreca D, Bellocco E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G, 2011. Kumquat (*Fortunella japonica Swingle*) juice: Flavonoid distribution and antioxidant properties. Food Research International, 44: 2190-2197.

Güney M, Öz AT, Kafkas E, 2015. Comparison of lipids, fatty acids and volatile compounds of various kumquat species using HS/GC/MS/FID techniques. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95 (6):1268-1273.

Jarvis BJ, 2017. Get acquainted with kumquat. Pasco County Cooperative Extension, Florida.

Liu Y, Liu Y, Liu Y, Liu H, Shang Y, 2018. Evaluating effects of ellagic acid on the quality of kumquat fruits during storage. Scientia Horticulturae, 227: 244-254.

Nalbantbaşı Z, Gölcü A, 2009. Kahramanmaraş Yöresine Ait Şifalı Bitkilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri. KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi, 12(2): 1-8.

Olcay N, Demir K, 2019. Kamkatın (*Fortunella* spp.) besinsel içeriği ve fonksiyonel özellikleri. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9(4):2124-2132.

Özüsağlam M, Günyaktı A, 2015. *Fortunella margarita* ve *Citrus myrtifolia* Bitkilerinin Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık 2015, Konya, s144.

Peng LW, Sheu MJ, Lin LY, Wu CT, Chiang HM,Lin WH, Lee MC, Chen HC, 2013. Effect of heat treatments on the essential oils of kumquat (*Fortunella margarita* Swingle). Food Chemistry, 136, 532-537.

Sadek ES, Makris DM, Kefalas P, 2009. Polyphenolic composition and antioxidant characteristics of kumquat (*Fortunella margarita*) peel fractions. Plant Foods of Human Nutrition, 64, 297-302.

Saman-Al M, Abdella A, Mazrou K, Tayel A, Irmak S, 2019. Antimicrobial and antioxidant activities of different extracts of the peel of kumquat (*Citrus japonica* Thunb). Journal of Food Measurement and Characterization, 13: 3221-3229.

Shanmugavelan P, Kim SY, Kim JB, Kim HW, Cho SM, Kim SN, Kim SY, Cho YS, Kim HR, 2013. Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC-ELSD. Carbohydrate Research, 380: 112-117.

Wang YW, Zeng WC, Xu PY, Lan YJ, Zhu RX,Zhong K, Huang YN, Gao H, 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) peel. International Journal of Molecular Sciences, 13: 3382-3393.

Olcay N, Demir MK, 2019. Nutritional Content and Functional Properties of Kumquat (*Fortunella* spp.). Journal of the Institute of Science and Technology, 9(4): 2124-2132.

Sağdıç O, Yetim H, Yılmaz H 2005. Doğal antimikrobiyal ve antioksidan madde kaynaklarımız: baharatlar ve türevleri. Gıda Kongresi, İzmir, 123-126.

Scordino O, Sabatino L, Belligno A, Gagliano G 2011. Preliminary study on bioactive compounds of *Citrus* × *myrtifolia* Rafinesque (Chinotto) to ıts potential application in food ındustry. Food and Nutrition Sciences, 2: 685-691.

# *Pistacia terebinthus* Meyve Ekstrelerinin *Bacillus cereus* ve *Micrococcus luteus* Üzerinde Antibakteriyel Aktivitesi ve Probiyotik Adayı Laktik Asit Bakterileri ile Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi

Meltem Asan-Ozusaglam*, Fatma Hilal Demir, Gülden Koç, Songül Tacer

Aksaray Üniversitesi, Fen edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü, Aksaray, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: meltemozusaglam@gmail.com

## ÖZET

*Pistacia terebinthus* (menengiç), Türkiye'de genellikle Güney ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde doğal olarak yetişmekte olan bir bitkidir. Bu çalışmada, menengiç meyve ekstrelerinin antibakteriyel aktivtesi belirlenmiştir. Bu amaçla, menengiç meyvelerinden aseton, etanol, metanol, hekzan, diklorometan, su çözücüleri ile sonikasyon yöntemi kullanılarak ekstreler hazırlanmıştır. Ekstrelerin antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Test bakterileri olarak *Bacillus cereus* RSKK 863 *ve Micrococcus luteus* NRLL B-4375 kullanılmıştır. Ayrıca anne sütü orijinli probiyotik adayı iki laktik asit bakterisi *Lactobacillus gasseri* MA-5 ve *Lactobacillus vaginalis* MA-10 üzerinde ekstrelerin antibakteriyel etkisi tespit edilmiştir. Disk difüzyon yönteminin sonuçlarına göre, menengiç meyve ekstreleri *B. cereus* RSKK 863 ve *M. luteus* NRLL-4375 karşı 12.24-18.74 mm ve 9.94-15.65 mm zon çapı ile antibakteriyel aktivite göstermiştir. Ekstrelerin MİK ve MBC değerleri ise 2.5-20 µg/µL ve 20-80 µg/µL olarak bulunmuştur. Ekstrelerin *L. gasseri* MA-5 ve *L. vaginalis* MA-10 üzerinde MİK ve MBC değerleri değerlendirildiğinde diğer iki test bakterisinin MİK ve MBC değerlerine yakın olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *P.terebinthus* meyve ekstreleri ve bu ekstrelerin test edilen probiyotik adayı LAB ile uygun konsantrasyonlardaki kombinasyonlarının gıda ve farmasötik sanayilerinde doğal koruyucular olarak kullanılma potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Menengiç, antibakteriyel aktivite, ekstre, sonikasyon

# Antibacterial Activity of *Pistacia terebinthus* Fruit Extracts against *Bacillus cereus* and *Micrococcus luteus* and Determination of Potential Use with Probiotic Candidate Lactic Acid Bacteria

## Abstract

*Pistacia terebinthus* (menengiç) is a plant that is usually grows wild in South and Southeast Anatolia Regions of Turkey. In this study, antibacterial activity of menengic fruit extracts will be determined. For this purpose, extracts were prepared from menengiç fruits by using sonication method with acetone, ethanol, methanol, hexane, dichloromethane and water solvents. Antibacterial activity of the extracts was tested using disc diffusion and microdilution methods. *Bacillus cereus* RSKK 863 and *Micrococcus luteus* NRLL B-4375 were used as test bacteria. In addition, antibacterial effects of the extracts were determined on two probiotic candidate lactic acid bacteria, *Lactobacillus gasseri* MA-5 and *Lactobacillus vaginalis* MA-10. According to the results of disc diffusion method, meningic fruit extracts showed antibacterial activity with a zone diameter of 12.24-18.74 mm and 9.94-15.65 mm against *B. cereus* RSKK 863 and *M. luteus* NRLL-4375. The MIC and MBC values of the extracts were 2.5-20 µg/µL and 20-80 µg/µL. When MIC and MBC values of *L. gasseri* MA-5 and *L. vaginalis* MA-10 of the extracts were evaluated, it was found that MIC and MBC values were close to the other two tested bacteria. As a result of this study, it was determined that *P.terebinthus* fruit extracts and combinations of these extracts with the probiotic candidate LAB tested in suitable concentrations have potential to be used as natural preservatives in food and pharmaceutical industries.

**Key words:** *Pistacia terebinthus*, antibacterial activity, extract, sonication

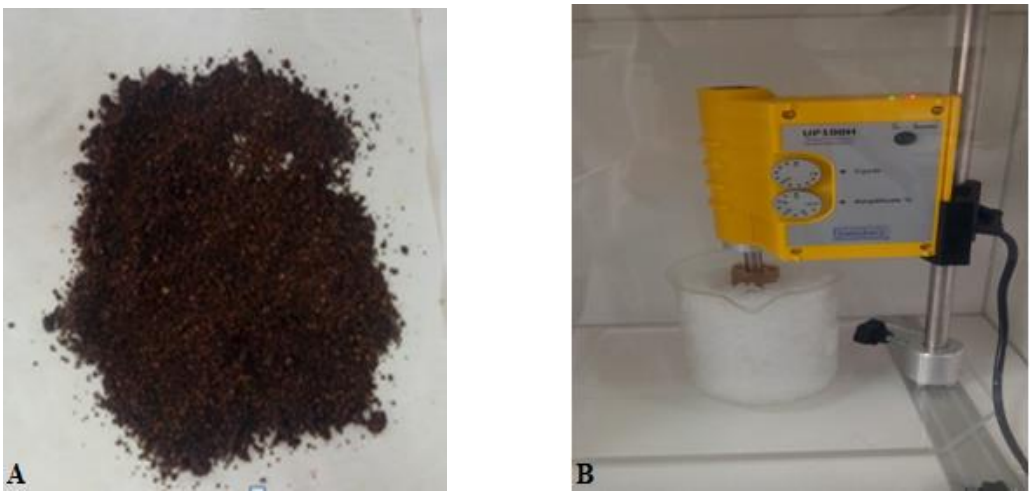
## GİRİŞ

*Pistacia terebinthus* (Menengiç), Anacardiaceae (Sakız ağacıgiller, antepfıstığıgiller) familyasının bir üyesi olan bu ağaç türü Asya ve Akdeniz'e özgü bir bitki olmakla birlikte, ülkemizde yaygın olarak Güney kesimlerde yetişir (Davis, 1970). *P. terebinthus*, fazlaca reçine kokusuna sahip olup meyveleri küçük mavi-yeşil renklidir. Menengiç ağaçları ülkemizin bitki örtüsünde doğal olarak yetişmektedir. *P.terebinthus*, antimikrobiyal, antienflamatuar, sitotoksik ve antioksidan potansiyele sahip doğal olarak yetişen bir bitkidir (Ciftci, ve ark., 2009). Bitkinin genç meyveleri gıda katkı maddesi olarak kullanılır. *P. terebinthus* türlerinin özellikle yaprakları, meyveleri, taze sürgünleri, çiçekleri, kökler ve kabuğu halk ilacı ve yiyecek olarak geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik amaçlar için kullanılmaktadır (Çapar, 2019). Ayrıca kavrulmuş meyveleri kuruyemişler gibi besleyici bir ürün olarak insanlar tarafından tüketilir (Yeşilada ve ark., 1995). Ülkemizin belli bölgelerinde yapılan sabun ve gittikçe yaygınlaşan menengiç kahvesi, son yıllarda türlerin ticari değerini artıracak uygulamalar olarak görülmektedir. Ayrıca, bitkinin çeşitli kısımlarından esansiyel yağ da elde edilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle menengiç, tıp, kozmetik ve parfümeri gibi sektörlere katkıda bulunabilen ve değerli bir tür olarak kabul edilen bir bitki türüdür (Gülsoy ve ark., 2013). Bu çalışmada, Menengiç meyve ekstrelerinin iki (*B. cereus* RSKK 863 ve *M. luteus* NRRL B-4375) test bakterisi üzerinde antibakteriyel aktivitesini belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca anne sütü orijinli probiyotik adayı iki laktik asit bakterisi (LAB) olan *L. gasseri* MA-5 ve *L. vaginalis* MA-10 üzerinde ekstrelerin antibakteriyel etkisi belirlenerek doğal koruyucu olarak hem ekstrelerin hem de ekstre ve LAB kombinasyonlarının sağlık ve gıda sanayilerinde kullanım potansiyellerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

### Materyal ve Metod

### Menengiç Meyve Ekstrelerinin Hazırlanması

*P. terebinthus* örnekleri, Adıyaman ilinde bulunan bir aktardan temin edilmiştir. Alınan menengiç örnekleri açık havada kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. 20 gr toz menengiç örneklerinden alınarak 30 ml çözücü (etanol, metanol, hekzan, aseton, diklorometan, saf su) ile 10'ar dakikalık sürelerde 3 tekrar şeklinde buz üzerinde sonikatörde ekstrakte edilmiştir (Şekil 1). Ekstraksiyon sonrasında süpernatant kısmı behere alınarak çözücüler buharlaştırılmıştır. Elde edilen ekstre kullanılıncaya kadar kuru koşullar altında 4°C'de muhafaza edilmiştir.




**Şekil 1.** Menengiç meyve ekstrelerinin hazırlanması

**(A)** Menengiç meyvesinin öğütülmüş hali

**(B)** Öğütülmüş menengiç meyvesinin sonikatörde ekstrakte edilmesi

## Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

### *Disk difüzyon yöntemi*

*P. terebinthus* meyve ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. *B.cereus* RSKK 863 ve *M.luteus* NRRL B-4375 test bakterileri kullanılmıştır. Ayrıca probiyotik adayı laktik asit bakterilerinden *L. gasseri* MA-5 ve *L. vaginalis* MA-10 suşları kullanılmıştır. *B.cereus* RSKK 863 ve *M.luteus* NRRL B-4375 bakterileri Nutrient, *L. gasseri* MA-5 ve *L. vaginalis* MA-10 bakterileri MRS besi yerlerinde 37°C'de kültürleri yapılmıştır. Test bakterileri serum fizyolojik ile iki defa yıkandıktan sonra konsantrasyonları 0.5 McFarland'a ayarlanmış ve daha sonrasında katı besi yerine ekimleri yapılmıştır. Ekimi yapılan petrilere steril diskler yerleştirildikten sonra disklere 20 µL (2000 µg/disk) menengiç meyve ekstreleri damlatılmıştır. Petriler 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülerek kaydedilmiştir. Tüm deneyler üç tekerrür olarak yapılmıştır.

### *Minimal inhibisyon (MİK) ve bakterisidal (MBC) konsantrasyonlarının belirlenmesi*

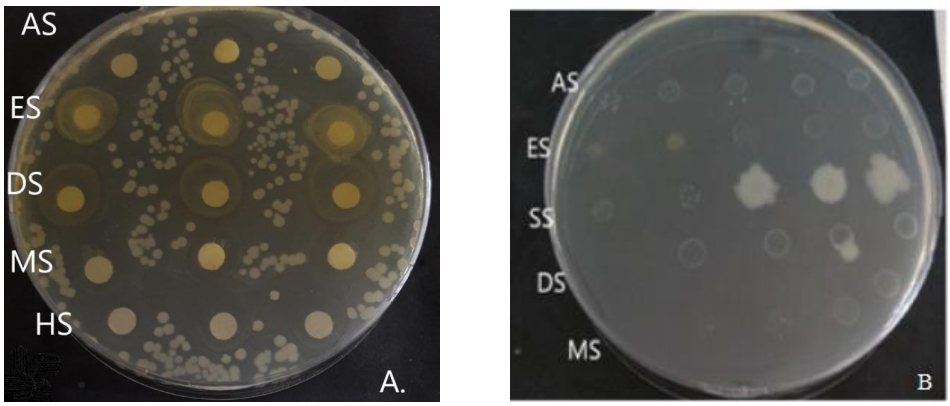
Ekstrelerin MİK ve MBC değerleri her iki test bakterisine karşı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstre ve besiyeri içeren her tüpe 0.5 konsantrasyonunda Mcfarland eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, sıvı besi yerinde gelişmenin olmadığı konsantrasyon MİK değerleri olarak kaydedilmiştir. Tüplerden örnekler alınarak Nutrient agar besi yerine ekimleri yapılmış ve 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, katı besi ortamı üzerinde bakterilerin gelişimini önleyen ekstre konsantrasyonları MBC değerleri olarak değerlendirilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

*P.terebinthus* meyve ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi *B.cereus* RSKK 863 ve *M.luteus* NRRL B-4375 test bakterileri üzerinde disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlenmiştir. *B.cereus*, toprak kökenli olup bu bakteriler için riskli gıdalar arasında et, süt, pirinç, pudingler, pastalar, sebzeler, balıklar, makarnalar ve peynir yer almaktadır (İncili ve ark., 2015). *M. luteus* ise toprakta, tozda, suda, gıdalarda ve havada bulunan ve memeli derisinin normal florasının bir parçası olarak bulunan aynı zamanda insan ağzı, mukozası ve üst solunum yolunda kolonize olan bir bakteridir (Anonim, 2018). Test edilen tüm ekstrelerin (2000 µg/disk) *B.cereus* RSKK 863 ve *M.luteus* NRRL B-4375 test bakterileri üzerinde antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 1). Disk difüzyon sonuçlarına göre en yüksek antimikrobiyal aktivite, meyve metanol ekstrede *B.cereus* RSKK 863 için 18.74 mm ve *M.luteus* NRRL B-4375 için ise 15.65 mm inhibisyon zon çapları ile tespit edilmiştir. Ekstrelerin, *B.cereus* RSKK 863 için MİK ve MBC değerleri 5-20 µg/µL ve 20-80 µg/µL olarak belirlenmiştir. *M.luteus* NRRL B-4375 için MİK ve MBC değerleri ise 2.5-20 µg/µL ve 20-40 µg/µL olarak tespit edilmiştir (Şekil 1, 2).

**Tablo 1.** Menengiç meyve ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi

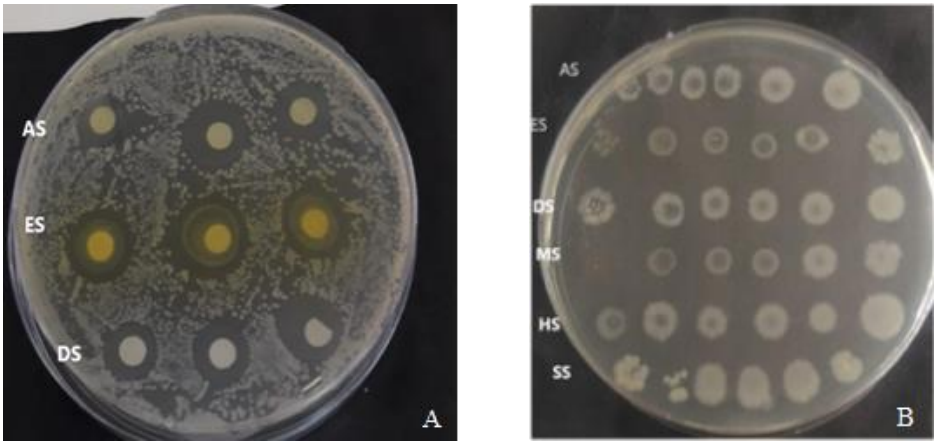
| Ekstreler | İnhibisyon zon çapı (mm) | | MIC (µg/µL) | | MBC (µg/µL) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *B. cereus* RSKK 863 | *M. luteus* NRRL B-4375 | *B.cereus* RSKK 863 | *M.luteus* NRRL B-4375 | *B.cereus* RSKK 863 | *M.luteus* NRRL B-4375 |
| **Aseton** | 14.77 ±1.42 | 13.93 ±1.69 | 20 | 10 | 40 | 40 |
| **Etanol** | 16.19 ±1.51 | 14.82 ±0.43 | 10 | 20 | 40 | 20 |
| **Metanol** | 18.74 ±0.53 | 15.65 ±0.60 | 5 | 20 | 20 | 20 |
| **Diklorometan** | 12.32 ±0.94 | 14.40 ±0.40 | 10 | 5 | 40 | 40 |
| **Hekzan** | 13.33 ±0.71 | 14.09 ±0.56 | 20 | 2.5 | 80 | 20 |
| **Su** | 12.24 ±1.25 | 9.94 ±0.43 | 10 | 5 | 20 | 40 |




**Şekil 1.**Menengiç meyve ekstrelerinin *M. luteus NRRL-4375* üzerinde antimikrobiyal aktivitesi

**(A)** Aseton (AS), etanol(ES), diklorometan (DS), metanol (MS) ve hekzan (HS) ile hazırlanan menengiç ekstrelerinin disk difüzyon sonuçları

**(B)** Aseton (AS), etanol (ES) ,saf su (SS), diklorometan (DS), metanol (MS) ile hazırlanan menengiç ekstrelerin MBC sonuçları




**Şekil 2.** Menengiç meyve ekstrelerinin *B. cereus* RSKK 863 üzerinde antimikrobiyal aktivitesi

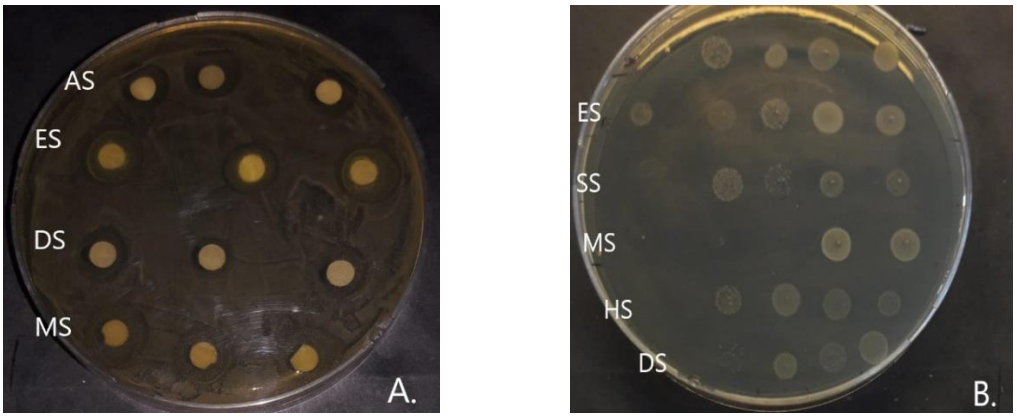
**(A)** Aseton (AS), etanol (ES) ve diklorometan (DS) menengiç meyve ekstrelerinin disk difüzyon sonuçları

**(B)** Menengiç meyve aseton (AS), etanol (ES), diklorometan (DS), metanol (MS), hekzan (HS), su (SS) ekstrelerinin MBC sonuçları

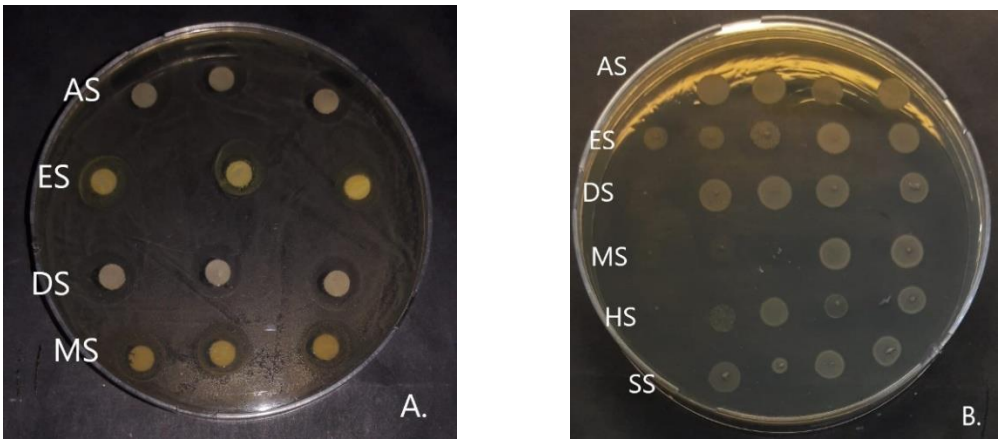
Antibakteriyel etki ayrıca anne sütü orijinli probiyotik adayı iki LAB (*L. gasseri* MA-5 ve *L. vaginalis* MA-10) üzerinde de belirlenmiştir. Laktik asit bakterileri, genellikle güvenli kabul edilen (GRAS) çeşitli proseslerde probiyotik kültür olarak yaygın olarak kullanılan ve konakçı üzerinde terapotik etkilere sahip mikroorganizmalardır (Gerez ve ark., 2013). Menengiç meyve ekstreleri (2000 µg/disk), *L. gasseri* MA-5 üzerinde 9.36-12.91 mm, *L. vaginalis* MA-10 üzerinde ise 10.58-12.16 mm inhibisyon zonları oluşturmuştur (Şekil 3A). Ekstrelerin test LAB üzerinde MİK değerleri 2.5-20 µg/µL, MBC değerleri ise 5-20 µg/µL olarak tespit edilmiştir (Tablo 2, Şekil 3B). Tüm test bakterilerinin MİK ve MBC değerleri değerlendirildiğinde birbirine yakın tespit edildiğinden menengiç meyve ekstrelerinin uygun konsantrasyonları kullanılarak ekstre ve LAB karışımları doğal koruyucular olarak sağlık ve gıda sanayilerinde kullanılma potansiyeli taşımaktadır.

**Tablo 2.** Menengiç meyve ekstrelerinin laktik asit bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisi

| Ekstreler | İnhibisyon zon çapı (mm) | | MIC (µg/µL) | | MBC (µg/µL) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *L.gasseri* MA-5 | *L.vaginalis* MA-10 | *L.gasseri* MA-5 | *L.vaginalis* MA-10 | *L.gasseri* MA-5 | *L.vaginalis* MA-10 |
| **Aseton** | 12.91 ±0.01 | 12.07 ±0.09 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| **Etanol** | 12.29 ±0.76 | 12.16 ±0.88 | 10 | 10 | 10 | 40 |
| **Metanol** | 12.30 ±0.90 | 11.29 ±0.76 | 2.5 | 2.5 | 5 | 10 |
| **Diklorometan** | 12.55 ±0.36 | 11.79 ±0.59 | 20 | 10 | 20 | 20 |
| **Hekzan** | 11.57 ±0.64 | 10.96 ±0.82 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| **Su** | 9.36 ±0.16 | 10.58 ±0.75 | 10 | 10 | 20 | 20 |




**Şekil 3.** Menengiç meyve ekstrelerinin *L.gasseri* MA-5 üzerinde antimikrobiyal aktivitesi
**(A)** Aseton (AS), etanol (ES), diklorometan (DS) ve metanol (MS) menengiç meyve ekstrelerinin disk difüzyon sonuçları
**(B)** Menengiç meyve etanol (ES),su (SS), metanol (MS), hekzan (HS)diklorometan (DS) ekstrelerinin MBC sonuçları




**Şekil 4.**Menengiç meyve ekstrelerinin *L.vaginalis* MA-10 üzerinde antimikrobiyal aktivitesi
**(A)** Aseton (AS), etanol (ES), diklorometan (DS) ve metanol (MS) menengiç meyve ekstrelerinindisk difüzyon sonuçları
**(B)** Menengiç meyve aseton (AS),etanol (ES),diklorometan (DS),metanol (MS),hekzan (HS),su (SS) ekstrelerinin MBCsonuçları

Yapılan çalışmalarda, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden (Siirt, Çanakkale, Kilis, Gaziantep) toplanan menengiç örnekleri ile farklı biyolojik aktiviteleri olduğu bildirilmiştir (Topçu ve ark., 2007; Çapar ve ark., 2017; Durak ve ark., 2015).Yapılan bir çalışmada *P.terebinthus* yaprak metanol, etil asetat ve kaynamış su ile hazırlanan ekstreleri 10 farklı test mikroorganizması üzerinde antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmada, ekstrelerin *Stapylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisi üzerine disk difüzyon inhibisyon zon çapı 9-12 mm ve *Salmonella typhimirium* ATCC 14028 için inhibisyon zon çapı ise 10-11 mm bulunmuştur (Poyrazoğlu Çoban ve ark., 2017). Ceylan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, Şırnak ilinden toplanan *P. terebinthus* metanol ekstreleri 13 farklı patojen mikroorganizmalara karşı denenmiştir. Çalışmada, ekstrelerin MİK değerleri *S. aureus* ATCC 6538 ve *Bacillus subtilis* NRRL-4378 için 1 mg/mL ve 0.5 mg/mL olarak bildirilmiştir (Ceylan ve ark., 2019).

## SONUÇ

Yaptığımız bu çalışma sonucunda, test edidlen *P.terebinthus* meyve ekstrelerinin tamamı gram pozitif *B. cereus* RSKK 863 ve *M. luteus* NRRL-4375 gıda kökenli test bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışma, *P.terebinthus* meyve ekstrelerinin ve bu ekstrelerin test edilen probiyotik adayı LAB ile uygun konsantrasyonlardaki kombinasyonlarının gıda ve sağlık sanayilerinde doğal antimikrobiyal kaynağı olarak kullanılma potansiyeli taşıdığını göstermiştir.

## KAYNAKLAR

Anonim 2018. Final screening assessment of *Micrococcus luteus* strain ATCC 4698. Environment and Climate Change Canada Health Canada. En14-313/2018E-PDF.

Ceylan S, Yarar R, Camadan Y, Saral Ö, ÖzsenBatur Ö 2019. Determination of antioxidant and antimicrobial activites of some medicinal plants grown in Sırnak region of Turkey. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(2): 628-638.

Ciftci H, Ozkaya A, Kariptas E, 2009. Determination of fatty acids, vitamins and trace elements in *Pistacia terebinthus* coffee. Journal of Food Agriculture Environment, 7(3-4): 72-74.

Çapar SÖ 2019. *Pistacia terebinthus* L. yapraklarının kimyasal içeriği ve farklı ekstrelerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü,Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi.

Davis P H, 1970. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3., Edinburgh.

Durak MZ, Uçak G 2015. Solvent optimization and characterization of fatty acid profile and antimicrobial and antioxidant activities of Turkish *Pistacia terebinthus L*. Extracts. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 39: 10-19

Gerez CL, Torres MJ, de Valdez GF, Rollan G 2013. Control of spoilage fungi bylactic acid bacteria. Biological Control, 64: 231-237.

Gülsoy S, Özkan G, Özkan K, Genç M 2013. Menengiç (*Pistacia terebinthus* L. subsp. *palaestina* (Boiss.) Engler) meyvelerinin bazı fiziksel ve fizikokimyasal özellikleri üzerine ekolojik faktörlerin etkisi. Türkiye Ormancılık Dergisi, 14(1): 15-23.

İncili GK, Dikici A, Çalıcıoğlu M 2015.*Bacillus cereus*. Turkiye Klinikleri Journal of Food Hygiene and Technology-Special Topics. 1(3): 87-91

Poyrazoğlu Çoban E, Biyik H, Törün B, Yaman F. 2017. Evaluation the Antimicrobial effects of *Pistacia terebinthus* L. and *Papaver rhoeas* l. extracts against some pathogen microorganisms, 51 (3): 377-379

Topçu G, Ay M, Bilici A, Sarıkürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chemistry, 103(3): 816–822.

Yeşilada E, Honda G, Sezik E, 1995. Traditional medicine in Turkey V. Folk Medicine in The Inner Taurus Mountains. Journal of Ethnopharmacology, 46: 133-155.

# Farklı fungusitlerin (kresoxim-methyl, propamocarb ve hymexazol) genotoksik potansiyellerinin *Drosophila* komet yöntemleri ile araştırılması

Merve Güneş* [1], Burçin Yalçın[1], Havva Ertuğrul[1], Bülent Kaya[1]

* [1] Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Türkiye

*mgunes@ogr.akdeniz.edu.tr

## Özet

Pestisitler yaklaşık 5000 yıldır çeşitli zararlılara karşı kullanılmaktadır. Farklı pestisitlerin, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkiler gibi farklı olumsuz etkileri uzun zamandır dikkati çekmektedir. Pestisitlerin organizmalara olan biyolojik etkileri çeşitli metodlar ile test edilmesine karşın elde edilen veriler yeterli değildir. Diğer taraftan her yıl birçok yeni pestisit kullanım amacıyla üretilmektedir. Fungusitler, bitkileri mantar ve mantar hastalıklarından korumak için kullanılmaktadır. Ürünlerin hasar görmesini önlemek ve hasat edilen ürünlerin depolanmasında veya taşınmasında bozulmaya karşı korumak için gıda ve süs bitkileri üzerinde fungusitler kullanılmaktadır. Bu çalışmada Türkiye'de tarımsal mücadelede yaygın bir kullanıma sahip olan kresoxim-methyl, propamocarb ve hymexazol'ün genotoksik potansiyelleri araştırılmıştır. Literatürdeki pestisit çalışmalarının büyük çoğunluğunu insektisit ve herbisit araştırmaları oluşturmaktadır ancak fungusitlerin yaygın kullanımına rağmen çok az kısmına ait in vivo ve in vitro araştırma bulunmaktadır. Bunların içindeki genotoksisite çalışmaları da oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan fungusitlerin 1, 5 ve 10 mM'lık dozlarının genotoksik potansiyelleri *Drosophila* Tek Hücre Jel Elektroforezi Testi (*Drosophila* Komet Testi) kullanılarak araştırılmış ve kuyruk uzunluğu parametresi ile değerlendirilmiştir. Son yıllarda genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *Drosophila*, insan genetik hastalıkları araştırmalarında, genetik ve moleküler yaklaşımların kullanılmasında güçlü bir sistem sağlamaktadır. Çalışmadan elde edilen sonuçlarda propamocarb'ın tüm dozlarında kresoxim-methyl ve hymexazol'ün ise yüksek dozlarında kuyruk uzunluğunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma pestisitlerin insan sağlığı ve olası genetik hastalıklar üzerine potansiyel etkileri hakkında önemli yeni veriler sunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Drosophila*, fungusit, genotoksisite, komet

# Investigation of genotoxic potential of different fungicides (kresoxim-methyl, propamocarb and hymexazol) by *Drosophila* comet methods

## Abstract

Pesticides have been used against various pests for about 5000 years. Different adverse effects of different pesticides, such as carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects, have long been noted. Although the biological effects of pesticides on organisms are tested by various methods, the data obtained are not sufficient.On the other hand, many new pesticides are produced every year for use. Fungicides are used to protect plants from fungal and fungal diseases. Fungicides are used on food and ornamental plants to prevent damage to crops and to protect them from deterioration in the storage or transport of harvested crops. In this study, genotoxic potentials of kresoxim-methyl, propamocarb and hymexazole which are widely used in agricultural struggle in Turkey were investigated. The majority of pesticide studies in the literature are insecticide and herbicide investigations, but despite the widespread use of fungicides, few in vivo and in vitro studies are available. Genotoxicity studies in these are also very limited. In this study, genotoxic potentials of 1, 5 and 10 mM doses of commonly used fungicides were investigated by using *Drosophila* Single Cell Gel Electrophoresis Test (*Drosophila* Comet Test) and evaluated with tail length parameter. *Drosophila*, which has been widely used in genetic studies in recent years, provides a powerful system for the use of genetic and molecular approaches in the research of human genetic diseases. The results of the study showed that tail length increased significantly in all doses of propamocarb and kresoxim-methyl and high doses of hymexazole. This study provides important new data on the potential effects of pesticides on human health and possible genetic diseases.

## GİRİŞ

Nüfusun sürekli artışı kullanılabilir tarım alanlarının da azalmasına neden olmaktadır. Artan nüfus ve daralan tarım alanları nedeniyle bu alanlardan maksimum verimin alınması gerekmektedir. Bu bağlamda, ürün verimini artırmak için tarım ürünleri çok sayıda pestisit vb. kimyasala maruz kalmaktadır (Tiryaki, 2010). Günümüze kadar farklı kullanım amaçlarıyla piyasaya pek çok pestisit sürülmüş ve bunlardan bazıları da gerekli testler yapılmadan uzun süre kullanılmıştır. Gerek farklı etkileri yeteri kadar kontrol edilmeden piyasaya sürülen gerekse yanlış kullanılan pestisitler, toprak kimyasının değişmesi, toprakların verimsizleşmesi ve pestisitlerin kullanıldığı bitki ve hedef dışı organizmalarda bazı genetik bozukluk oluşması gibi birçok olumsuz sonuçlar görülebilmektedir (Shelton ve ark., 2012; Kwasniewska ve ark., 2015; Siegwart ve ark., 2015). Pestisitler,yaygın olarak haşere kontrolünde, endüstriyel tarımda, bahçecilikte, evlerde ve toprak tedavilerinde, hastalıklara karşı mücadelede, ürünleri korumak amacıyla kullanılan temel öneme sahip kimyasal maddelerdir. Pestisit kullanımının en yaygın amacı su, atmosfer ve çevreden kaynaklanan zararlılara karşı insan ve çevre sağlığını korumaktır (Konradsen ve ark., 2003).

Pestisitler, görünüş, fiziksel yapı ve formülasyon şekillerine göre, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik dönemine göre, içerdikleri aktif maddenin cins ve grubuna göre, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılabilmektedir. Pestisitler insektisit, akarisit, nematisit, rodentisit, fungusit, herbisit, bakterisit, algisit, repellentler vb. gibi etkiledikleri zararlı gruplarına göre çeşitli alt dallara ayrılabilmektedir. Ancak kullanım oranlarına göre en önemli üç büyük pestisit grubu, insektisit, fungisit ve herbisitlerdir (Tiryaki, 2010; Kubilay, 2013).

Pestisitlerin büyük bir sınıfı olan fungusitler, birçok mantar hastalıkları ile mücadelede ve bitki hastalıklarını önlemek için kullanılmaktadır. Tarımda fungusitler, kök, sebze ve meyvelerin depolanması sırasında ya da süs bitkileri, ağaçlar, tarla ürünleri, tahıl ve çim bitkilerine doğrudan uygulanmaktadır (Gupta, 2007; Carisse, 2010). Pestisitlerin önemli bir sınıfı olan tarımsal fungusitler, mantar ve mantar sporlarını inhibe etmek veya öldürmek için kullanılmaktadır. ABD'de resmi olarak bilinen pestisit sayısı 67000'dir. Bunlardan 3600'den fazlası fungusitlerdir (Reilly ve ark., 2012).

Drazoxolon, vinclozolin, chlozolinate, oxadixyl ve famoxadone'un da içinde yer aldığı oxazole fungusitler grubunda bulunan ve toprak fungusiti olan Hymexazol (5-hydroxy-5-methylisoxazol) sistemik fungusittir (Vinas ve ark., 2010). Phytium, Fusarium ve Rhizoctonia gibi patojenlerin sebep olduğu "damping-off" (çökerten) hastalıkların kontrolünde kullanılmaktadır (Kamimura ve ark., 1974; Nakamura ve ark., 1978; Al-Sadi ve ark., 2011; Ali-Shtayeh ve ark., 2003). Kresoxim-methyl (methyl (E)-2-(methoxyimino)-2-[2-(o-tolyloxymethyl) phenyl] acetate) sentetik strobilurinler sınıfında bulunan bir fungusittir (Nie ve ark., 2015). Sentetik strobilurinler, yeni nesil ve büyümekte olan fungusit ailesidir. Doğal strobilurinler bitki koruma için uygun olmadığından çeşitli incelemeler yapılarak istenilen özelliklere sahip sentetik strobilurinlerin üretilmesi için çeşitli kimyasal modifikasyonlar yapılmıştır (Cui ve ark., 2017; Kolosova ve ark., 2017). Benzimidazolylcarbamate, tolprocarb, picarbutrazox, benthiavalicarb-isopropyl ve thiophanate da içerisinde bulunduğu karbamatlı fungusitler sınıfında bulunan Propamocarb ((propyl 3-(dimethylamino) propylcarbamate hydrochloride) sistemik bir fungusittir (Möller ve ark., 2009, ChEBI 2015). Bu çalışmada, ülkemizde tarımsla mücadelede yaygın bir kullanıma sahip olan 3 farklı fungusitin (Hymexazol, resoxim-methyl, Metiram) genotoksik potansiyelleri *in vivo Drosophila* KOMET yöntemiyle çalışılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, 4 farklı fungusitin (Metiram, Propamocarb, Kresoxim-methyl ve Hymexazol) literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak ve ön uygulamalar sonucunda belirlenen 3 farklı konsantrasyonunun (1, 5 ve 10 mM) genotoksisitesi *D. melanogaster* hemositlerinde tek hücre alkali jel elektroforezi (KOMET) testi ile belirlenmiştir.

### *Drosophila melanogaster*

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan *D. melanogaster* genetik araştırmalar için iyi bir model organizmadır. Son yıllarda yapılan birçok çalışma, *D. melanogaster* insan hastalıklarının pek çok yönüyle çalışılmasını sağlayan bir model organizmadır (Giot ve ark. 2003, Paaby ve Schmidt 2009; Millburn ve ark. 2016). *Drosophila* genom dizi analizi, insan hastalıklarında belirlenen genlerin %77'inin *Drosophila* ortoloğu olduğunu belirtilmiştir (Reiter ve ark., 2001). Böylelikle; insan hastalıklarında mutasyon, amplifikasyon veya

delesyon ile değişime uğrayan 287 genin *Drosophila* ortoloğu olduğu ortaya çıkmaktadır (Rubin ve ark. 2000). *Drosophila* ve insan hücre döngülerinin ve düzenleyici yollarının benzerliği tümörgenezis esnasında çoğalma süreci çalışmalarında bir model olarak hizmet etmektedir (Potter ve ark 2000). *D. melanogaster*, ideal yaşam koşullarına (25 °C ve % 60 bağıl nemde) sahip özel iklim odasında standart Lewis besin ortamında (Lewis ve Bacher 1968) kültüre alınmaktadır.

### *Drosophila* Hemositlerinde KOMET veya Tek Hücre Alkali Jel Elektroforezi (SCGE) Testi

KOMET testi, ökaryotik hücrelerde farklı bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan hızlı, basit, ucuz, güvenilir ve hassas bir tekniktir ve genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Singh vd., 1988; Mukhopadhyay vd., 2004; Siddique vd., 2005; Carmona vd., 2011a, b, c; Demir ve Kaya, 2013; Shukla, 2011). Bu çalışma kapsamında da 3 fungusitin (Propamocarb, Kresoxim-methyl ve Hymexazol) *Drosophila* hemositlerinde muhtemel DNA hasarı etkisi KOMET testi ile belirlenmiştir. Negatif kontrol grubunda kimyasalların farklı konsantrasyonlarının hazırlanmasında kullanılan distile su uygulaması yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak 4 mM'lık EMS uygulaması yapılmıştır. *Drosophila* Oregon R+ hattından 8 saatlik periyotta toplanan yumurtalar 72±4 saatlik (3. larval evre) olduklarında Propamocarb, Kresoxim-methyl ve Hymexazol'ün 3 farklı konsantrasyonuna (1, 5 ve 10 mM) maruz bırakılmıştır. Uygulama, 72±4 saatlik larvaların yaklaşık 4.5 gramı kuru halde bulunan *Drosophila* hazır besininin (*Drosophila* Instant Medium) hazırlanacak kimyasal madde derişimlerinin 9 ml'si ile ıslatılmasıyla oluşan besin ortamında 24 saat bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Larvalar 96±4 saatlik olduklarında her bir uygulama grubundaki larvalar bir elek yardımı ile musluk suyu altında toplanmış ve %5'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde steril edilmiştir. Her bir uygulama grubundan toplanan Irving vd (2005) metoduna göre toplanmıştır. İzole edilen hemositler +4°C'de 10 dakika 300xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak soğuk 20 µl PBS solusyonu ile süspanse edilmiştir. Daha sonra Singh vd (1988) belirlediği KOMET prosedürüne prepratlar hazırlanmıştır. Elde edilen preparatlarda her bir preparat için 50 hücre 40X büyütmede Floresans mikroskopta (Nikon Eclipse E200) sayılmıştır. Değerlendirme parametresi olarak Tail Length (Kuyruk Uzunluğu) kullanılmıştır.

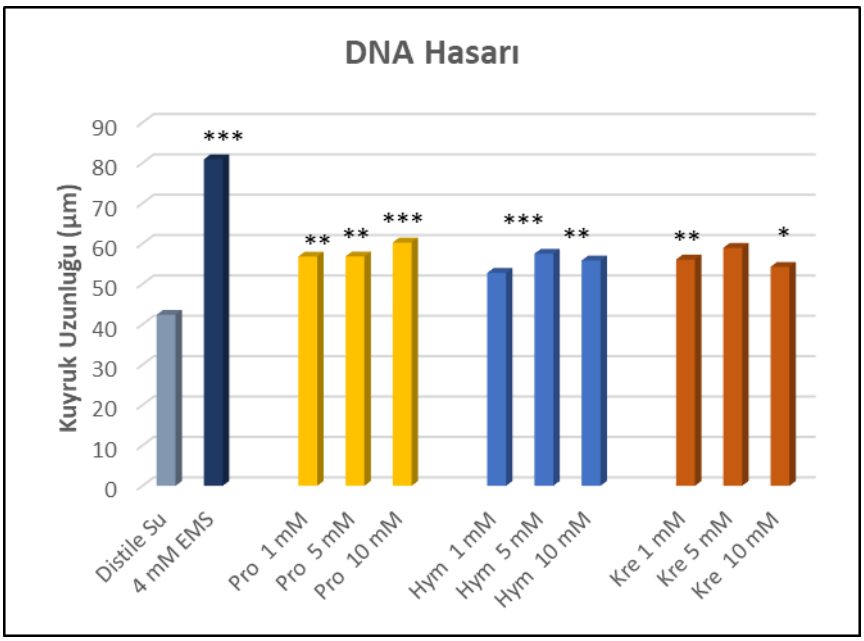
### İstatistiksel Değerlendirme

Bütün ölçümler Floresans mikroskopta KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm şeklinde yapıldıktan sonra elde edilen sonuçlar IBM SPSS Statistics 23 paket programı ile One-way ANOVA (Tukey testi) kullanılarak değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

KOMET sonucuna göre pozitif kontrol grubu olan EMS uygulamasında kuyruk uzunluğu bakımından istatistiki olarak kontrol grubuna göre anlamlı tek iplik DNA hasarı gözlenmiştir.

Propamocarb 1, 5 ve 10mM'lık konsantrasyonlarda doza bağlı olarak artan genotoksisiteye neden olmuştur. Hymexazol'ün yüksek dozları olan 5 ve 10 mM'lık uygulamalarında kuyruk uzunluğu bakımından istatistiki olarak anlamlı pozitif sonuç gözlenmiştir. Kresoxim-methyl uygulama sonuçlarında ise 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda anlamlı pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo 1).




**Şekil 1.** KOMET Testinde Drosophila hemositlerinde Propamocarb, Hymexazol ve Kresoxim-methyl Uygulamasından Sonra Meydana Gelen DNA Hasarı

## TARTIŞMA

1930'lu ve 1940'lı yıllarda geliştirilen DDT, 2,4-D ve thiram gibi farklı pestisitlerin geliştirilmesiyle pestisitlerin insanlara, ürünlere ve çevre üzerine olan farklı etkiler merak uyandıran konulardan bir tanesi olmuştur (Krieger, 2010). Günümüze kadar farklı kullanım amaçlarıyla piyasaya pek çok pestisit sürülmüş ve bunlardan bazıları da gerekli testler yapılmadan uzun süre kullanılmıştır. Bunun yanı sıra kontrolsüz ve aşırı kullanılan bazı pestisitlerin doğada kalıcılığının uzun olması nedeniyle olumsuz etkileri de uzun süre devam edebilmektedir. Fungusitler evsel, tarımsal ve endüstriyel alanlarda tarımsal ürünlerin yetiştirilmesi, depolanması ve taşınması gibi farklı alanlarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında iç mekanlarda fungus kontrolünde de kullanım alanları bulunmaktadır. Fungusitler bitkilere etki eden mantarların gelişimini engelleyerek hastalıkların oluşmasını engellemektedir (Akyıl, 2006). Ticari tarım ürünlerinin yetiştirilmesinde hastalık ve zararlılarla mücadele önemli kültürel işlemlerin arasında yer almaktadır. Hasatı yapılan ürünlerde çeşitli mantar hastalıklarını önlemek amacıyla kontakt veya sistemik etkili fungusitler kullanılmaktadır (Dülgeroğlu, 2012).

Kimyasal zirai mücadele, tarımda bitki koruma için yaygın olarak kullanılmaktadır. Pestisitlerin yoğun kullanımı, doğrudan veya dolaylı olarak maruz kalmış toprak, su ve atmosferin kirlenmesine yol açmakta ve insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri hakkında endişeleri de beraberinde getirmektedir (Vera ve ark., 2011). Fungal ve oomycete propagülleri çiftliklere, tohumlar, saksı karışımları, organik gübreler, ekili toprak, böcekler ve sulama suyu dahil olmak üzere birçok farklı kaynak yoluyla bulaşabilmektedir. Seralar ve çiftliklerde hastalık problemlerinin artması, bu hastalıklardan kaynaklanan kayıpları azaltmak için çeşitli yöntemlerin denenmesini gerektirmiştir. Çoğu üretici, yetiştirilen toprağı çiftliğin dışından getirilen ıslah edilmemiş toprakla değiştirerek veya patojenleri öldürmek için çiftlik topraklarını fumigasyon veya solarize ederek bu mantarlardan korunmaya çalışmaktadır. Buna ek olarak bazı fungusitler de kullanılmaktadır (Al-Sadi ve ark., 2011).

Wu ve ark. (2005) çalışmalarında insan hepatoma hücre hattı (HepG2)'nda Hymexazol ile birlikte oxazole fungusitler grubunda bulunan vinclozolin 24 saatlik uygulamaları sonucunda 50, 100, 200 ve 400 µM'lık dozlarda genotoksisite, 400 µM'lık dozda sitotoksisite tespit etmişlerdir. Sanchez-Argüello ve ark. (2012) *Physella acuta*'da vinclozolinin embriyo toksisitesi ve genotoksik etkilerini araştırmıştır. Vinclozolin düşük embriyo toksisitesi, 5 mg/L dozunda genotoksisite gözlemlemişlerdir. 90 günlük besleme çalışmaları ile Hymexazol'ün subakut toksisite etki düzeyleri ratlar için 1800 ppm (130mg/kg/gün)- 5000 ppm (300mg/kg/gün) ve farelerin 2500 ppm (375mg/kg/gün) olarak gösterilmiştir. 2 yıllık besleme çalışmaları ile Hymexazol'ün kronik toksisite etki düzeyleri ratlar için 300 ppm (20mg/kg/gün) ve beagle köpekleri için 15 mg/kg/gün olarak gösterilmiştir. Teratojenite ve üç nesil üreme çalışmalarında sırasıyla 180 ppm-1800 ppm'e

kadar olan diyet düzeylerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Mikroorganizmalarla yapılan mutajenez çalışmasında yüksek konsantrasyonlarda bile negatif sonuç gözlenmiştir. Hymexazol'ün kuşlara ve balıkları yönelik etkileri önemsizdir (Nakamura ve ark., 1978).

Regueiro ve ark. (2015) çalışmalarında 9 fungusitin (kresoxim-methyl, ametoctradin, boscalid, cyazofamid, dimethomorph, fenhexamid, mepanipyrim, metrafenone ve pyraclostrobin) primer kültüre edilmiş kortikal nöronlar üzerindeki toksisitesini araştırmışlardır. 7 gün 0.1-100 µM konsantrasyonlarda *in vitro* maruziyet sonucunda MTT hücre canlılık testinde doza bağımlı toksisite gözlenmiştir. Liu ve ark. (2013) çalışmalarında, Çin'de en önemli su ürünleri yetiştirme türlerinden olan ot sazanının (*Ctenopharyngodon idella*) erken yaşam aşamasında, üç ortak strobilurin türevi fungisidin (trifloxystrobin (TFS), azoxystrobin (AZ) ve kresoxim-methyl (KM)) akut toksisitesini ölçmek üzere araştırmışlardır. Çalışılan fungisitler katalaz (CAT) ve peroksidaz (POD) aktivitesini arttırmış ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini azaltmıştır ve üç büyümeyle ilişkili genin (IGF-1, IGF-2 ve GHR) ifadelerini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ayrıca iki enerji ile ilgili gen (CCK ve PYY) ve bir stres geninin (HSP70) aşırı ifadesine neden olmuştur. Bu çalışma ile *C. idella*'nın erken gelişimi üzerine TFS, AZ ve KM'nin potansiyel toksik etkileri ortaya konmuştur.

Aydemir ve Bilaloğlu (2004) Propamocarb'ın genotoksik etkilerini Swiss albino farelerde kemik iliğinde mikronukleus ve kromozom sapmaları testleri ile araştırmışlardır. Propamocarb'ın, MN sıklığını artırmadığı, ancak tüm örnekleme aralıklarında polikromatik/normokromatik eritrosit oranını azalttığı saptanmıştır. Propamocarb maruziyeti sonrası fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal sapmaların sayısının (boşluklar dahil) önemli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak boşluklar hariç tutulduğunda, kontrol ve doz grupları arasında toplam sapmalarda önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Propamocarb, negatif kontrol grubuna kıyasla mitotik indeksi düşürdüğü saptanmıştır. Falfushynska ve ark. (2013) çalışmalarında fungusit karışımı (propamocarb ve mankozeb karışımı, 91 µg/$L^{-1}$)'nın tatlı su midyelerinin üzerindeki etkisini araştırmışlardır. İki farklı bölgeye [kirli (A) ve kirletilmemiş (F)] ait çift kabuklu mollusca *Anodonta anatina* fungusit karışımına 14 gün maruz bırakılmıştır. MN ve nükleer anormalliklerin seviyeleri, her iki bölgedeki kontrol grubu midyelerinde benzer şekilde düşükken (yaklaşık % 2) uygulama sonrasında 4-5 kat arttığı belirlenmiştir. Her iki maruz kalmış grupta da DNA- zincir kırılma seviyesi de yükselmiştir. Oksiradikal konsantrasyonun yükselmesi, A ve F bölgelerinde elde edilmiş olan önemli sonuçlardan bir tanesidir. Bu nedenle, maruz kalmanın bir sonucu olarak oksidatif hasarın indüklendiği doğrulanmıştır. Karbamat, kolinesteraz tükenmesine ve sitotoksisiteye neden olmamıştır. Ancak her iki bölgede de genototksisite ve pro-oksidan etkiler açısından biribirine yakın yanıt vermiştir.

## SONUÇ

Nüfus artışı, beraberinde tarım alanlarının da azalmasına neden olmaktadır. Artan nüfus ve daralan tarım alanları nedeniyle kullanılabilir alanlardan maksimum verimin alınması gerekmektedir. Bu bağlamda, ürün verimini artırmak için tarım ürünleri çok sayıda pestisite maruz kalmaktadır. Tarım ülkesi olan ülkemizde de tarım ilacı tüketimi ortalama 33.000 tondur ve bu miktar her yıl giderek artmaktadır. Kullanılan pestisitlerin % 47'sini insektisitler, % 24'ünü herbisitler, % 16'sını fungisitler, % 13'ünü de diğer gruplar oluşturmaktadır (Tiryaki, 2010). Pestisitlerin büyük bir sınıfı olan fungusitler, birçok mantar hastalıkları ile mücadelede ve bitki hastalıklarını önlemek için kullanılır. Tarımda fungusitler, kök, sebze ve meyvelerin depolanması sırasında ya da süs bitkileri, ağaçlar, tarla ürünleri, tahıl ve çim bitkilerine doğrudan uygulanır (Gupta, 2007; Carisse, 2010). Tarımsal fungusitler pestisitlerin önemli bir sınıfıdır, mantar ve mantar sporlarını inhibe etmek veya öldürmek için kullanılmaktadır (Reilly ve ark., 2012). Fungusitlerin aşırı dozda kullanımı, ilaçlama ve hasat dönemlerine dikkat edilmemesi, amacına uygun olmayan pestisit kullanımı ve araç gereçlerdeki yetersizliklerden dolayı ürünlerde pestisit kalıntıları bulunabilmektedir. Yaygın ve bilinçsiz pestisit kullanımı bu kimyasalların insan ve çevre sağlığı üzerine yaratabileceği potansiyel riskleri hakkında endişe yaratmaktadır. Pestisit toksikolojisi ile ilgili yapılan çalışmaların toplum sağlığını doğrudan ilgilendirmesi açısından *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri ve farklı model organizmalar veya hücre hatları kullanılarak değerlendirilmesi de gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma 116Z029 proje numarası ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir.

**KAYNAKLAR**

Akyıl D 2006 Farklı Tipteki Fungusitlerin Muhtemel Mutajeniteleri Üzerine Bir Çalışma (Yüksek Lisans Tezi) Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Ali-Shtayeh M, Salah AMA, Jamous RM 2003 Ecology of hymexazol-insensitive Pythium species in field soils, Mycopathologia, 156: 333–342.

Al-Sadi AM, Al-Said FA, Al-Jabri AH, Al-Mahmooli IH, Al-Hinai AH, de Cock AWAM 2011 Occurrence and characterization of fungi and oomycetes transmitted via potting mixtures and organic manures, Crop Protection, 30: 38-44.

Aydemir N., Bilaloğlu R 2004 The investigation of the genotoxic effects of fenarimol and propamocarb in mouse bone marrow in vivo, Toxicology Letters, 147: 73–78.

Carisse O 2010. Fungicides. Crotia: InTech.

Carmona ER, Creus A, Marcos R 2011a. Genotoxic effects of two nickel-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, Mutation Research, 718: 33-7.

Carmona ER, Creus A, Marcos R 2011b. Genotoxicity tetsing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, Mutation Research, 724: 35-40.

Carmona ER, Creus A, Marcos R 2011c Genotoxicity tetsing of two lead compounds in somatic cells of Drosophila melanogaster. Environ. Mol. Mutagen, 724: 35-40.

CheBI(Chemical Entities Of Biological Interest). 2015. CHEBI:82033-Propamocarb Https://www.ebi.ac.uk/chebi/init.do Son Erişim Tarihi: 15.07.2015

Cui F, Chai T, Liu X, Wang C 2017 Toxicity of Three Strobilurins (Kresoxim-Methyl, Pyraclostrobin, and Trifloxystrobin) on Daphnia magna, Environmental Toxicology and Chemistry, 36 (1): 182–189.

Demir E, Kaya B 2013 Studies on the genotoxic properties of four benzyl derivatives in the in vivo Comet assay using haemocytes of Drosophila melanogaster. Fresen. Environ. Bull., 22 (5): 1590-1596.

Dülgeroğlu Y 2012 Salamuralık Asma Yaprağı Üretiminde Fungusit Kalıntı Miktarı Üzerine Hasat Zamanı Ve Salamura Yöntemlerinin Etkisi (Yüksek Lisans Tezi) Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Stoliar OB 2013 In situ exposure history modulates the molecular responses to carbamate fungicide Tattoo in bivalve mollusk, Ecotoxicology, 22: 433–445.

Giot L, Bader J S, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi C E, Godwin B, Vitols E, et al, 2003. A Protein İnteraction Map of Drosophila Melanogaster, Science, 5;302(5651): 1727-36.

Gupta PK., Aggarwal M 2007 Veterinary Toxicology, New York: Elsevier.

Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, Hoffmann JA, Hetru C, Meister M 2005 New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis, Cell Microbiol., 7: 335-350.

Kamimura S, Nishikawa M, Saeki H, Takahi Y 1974 Absorption and Metabolism of 2-Hydroxy-5-methylisoxazole in Plants and the Biological Activites of its Metabolites. Phytopathology, 64: 1273-1281.

Kolosova A, Maximova K, Eremin SA, Zherdev AV., Mercader, J.V., Abad-Fuentes, A., Dzantiev, B.B. 2017. "Fluorescence polarisation immunoassays for strobilurin fungicides kresoxim-methyl, trifloxystrobin and picoxystrobin". Talanta, 162: 495–504.

Konradsen, F, Hoek W, Cole DC, Hutchinson G, Daisley H, Singh S, Eddleston M 2003 Reducing acute poisoning in developing countries options for restricting the availability of pesticides, Toxicology, 192: 249–261.

Kubilay B 2013 Karbamatlı pestisitlerden carbaryl'in tatlı su istakozlarında akut toksik etkisinin belirlenmesi, (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kwasniewska K, Gadzala-Kopciuch R, Cendrowski K 2015 2- Analytical Procedure for the Determination of Zearalenone in Environmental and Biological Samples, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 45(2): 119-30.

Lewis EB, Bacher F 1968 Methods of feeding ethylmethanesulfonate (EMS) to Drosophila males". Drosophila Information Service, 43: 193.

Liu L, Jiang C, Wu Z-Q, Gong Y-X, Wang G-X 2003 Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (Ctenopharyngodon idella) juveniles, Ecotoxicology and Environmental Safety, 98: 297–302.

Millburn GH, Crosby MA, Gramates LS, Tweedie S 2016 FlyBase portals to human disease research using Drosophila models". Dis Model Mech. 9(3):245-52.

Möller K, Dilger M, Habermeyer J, Zinkernagel V, Flier WG, Hausladen H 2009 Population Studies On Phytophthora İnfestans On Potatoes And Tomatoes İn Southern Germany", Eur J Plant Pathol, 124: 659–672

Nakamura T, Yamaoka K, Kotakemorı M 1978. Sayfa 215. Pesticides and Plant Growth Regulators. Editör: Zweig, G. New York: Academic Press.

Nie Y, Zhang K, Chen H, Zhang W, Zhu H, Hu D. 2015. Dissipation and residue fate of kresoxim-methyl in tobacco leaves and soil under field conditions. International Journal of Environmental Analytical Chemistry .95 (14).1338-1352

Paaby A, Schmidt PS 2009 Dissecting the genetics of longevity in Drosophila melanogaster. Fly 3:1, 1-10.

Potter CJ, Turenchalk GS, Xu T. 2000. Drosophila in cancer research, TIG, 16: 33-9.

Regueiro J, Olguín N, Simal-Gándara J, Suñol C 2015 Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons", Environmental Research, 140: 37–44.

Reilly TJ, Smalling KL, Orlando JL, Kuivila KM 2012 Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States, Chemosphere, 89: 228–234.

Rubin GM, Lewis EB 2000 A brief history of Drosophila's contributions to genome research, Science., 24;287(5461): 2216-8.

Sanchez-Arguello P, Aparicio N, Fernandez C.2012 Linking embryo toxicity with genotoxic responses in the fresh water snail Physa acuta: Single exposure to benzo(a)pyrene, fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with benzo(a)pyrene. Ecotoxicology and Environmental Safety 80: 152–160.

Shelton JF, Hertz-Picciotto I, Pessah IN 2012 Tipping the Balance of Autism Risk: Potential Mechanisms Linking Pesticides and Autism, Environmental Health Perspectives, 120(7).

Shukla AK, Pragya P Kar Chowdhuri D 2011 A modified alkaline Comet assay for in vivo detection of oxidative DNA damage in Drosophila melanogaster, Mutat. Res., 726: 222-226.

Siddique HR, Chowdhuri DK, Saxena DK, Dhawan A 2005 Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay, Mutagenesis, 20, 285-90.

Siegwart M, Graillot B, Lopez CB, Besse S, Bardin M, Nicot PC, Lopez-Ferber M 2015 Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review, Frontiers in Plant Science, 6:381.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL 1988 A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Experimental Cell Research, 175: 184-91.

Tiryaki O, Canhilal R, Horuz S 2010 Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 26(2): 154-169.

Wu X-J, Lu W-Q, Roos PH, Mersch-Sundermann V. 2005 Vinclozolin, A Widely Used Fungizide, Enhanced Bap-İnduced Micronucleus Formation İn Human Derived Hepatoma Cells By İncreasing CYP1A1 Expression, Toxicology Letters 159: 83–88

# The Effects of Acrylamide and Vitamin E on Pregnancy Model Rats

Mehmet Erman Erdemli 1*

*1 Inonu University, Medical Faculty, Medical Biochemistry, Malatya, Turkey.

e-mail:ermanerdemli@hotmail.com

## Abstract

The effects of Acrylamide (AA) and Vitamin E (Vit E) on various rat tissues were investigated during pregnancy (days 0-20). On the last day of pregnancy, the pregnancies were terminated with cesarean section under anesthesia and examined. In the study, where 5mg/kg AA and 100 mg/kg Vit E were administered, an increase in oxidative stress parameters in fetal brain and placenta tissues and histopathological damages were determined in postnatal AA administration group, while these parameters improved in the AA + Vit E group when compared to the AA group. In another study, where 5 mg/kg AA and 100 mg/kg Vit E were administered, the impact on postpartum maternal rats and fetus liver tissues were investigated. It was reported that while the oxidative stress parameters were affected in the AA group maternal liver tissues, AA + Vit E group exhibited an improvement when compared to the AA group, while AA and Vit E administration did not induce any changes in the fetal liver tissue oxidative stress parameters. In a study where 10 mg/kg AA and 100 mg/kg Vit E were administered to investigate their effects on maternal and fetal rat kidney tissues, deterioration in biochemical parameters and histopathological findings was determined in both maternal and fetal kidney tissues in the AA administration group. The study also reported significant improvements in the AA + Vit E group when compared to the AA group. AA led to oxidative stress in tissues and increased oxidant capacity and decreased antioxidant capacity and caused tissue damages. Vit E could shift antioxidant/oxidant balance in favor of antioxidants via its strong antioxidant properties. Based on the present study findings, we recommend the consumption of fresh nutrients with adequate Vit E content daily for both maternal and fetal health during pregnancy.

**Keywords:** Acrylamide, vitamin E, pregnancy, oxidative stress, rat.

## INTRODUCTION

Acrylamide (AA) is a water soluble monomer used in chemical manufacturing technology. Synthetically produced Acrylamide (AA) is not found in nature; it is a water-soluble substance that is widely used in research laboratories as polyacrylamide gel, especially in biochemistry and genetics, in the textile, printing, cosmetic industries (Exon 2006). In scientific research conducted in 2000s, it was demonstrated that high amounts of acrylamide formation was detected in food exposed to temperatures exceeding 120 $^0$C due to the interaction of monosaccharides and asparagine amino acid (Lingnert et al., 2002; Tareke et al., 2002). The real danger for humans is the formation of AA spontaneously via the Maillard reaction between asparagine amino acid and monosaccharides during frying and baking food at temperatures of 120 ° C and above (Parzefall 2008). Based on this fact, studies on food-borne AA toxicity have increased. AA could have neurotoxic, fertility toxicity and carcinogenic effects as a result of various mechanisms and is defined as “carcinogen for humans” by International Agency for Research on Cancer (IARC, 1997). Studies conducted with humans and experimental animals demonstrated that AA causes neurotoxicity (Spencer et al., 1979; Sickles et al., 1985). Daily average AA intake dose was reported as 0.5 mg/kg/day; however, the intake dose varies based on factors such as lifestyle, nutritional habits, age, and gender (Dybing et al., 2005; Bjellas et al., 2007). Acrylamide causes oxidative stress by disrupting the oxidant/antioxidant balance in the body. Generally, acrylamide decreases the reduced glutathione (GSH) levels and increases lipid peroxidation levels in tissues. All of these tissue damages are suggested to originate from the oxidative stress caused by acrylamide (Allam et al., 2011; Muralidhara, 2014; El-Sayad et al., 2011).

Vitamin E (Vit E) is a significant fat-soluble antioxidant that could be found in four tocopherol forms of a (alpha), b (beta), g (gamma), d (delta). It prevents the oxidative stress formed by free radicals in the fat phase of the cell, thus protecting the cells against oxidative stress. It creates that effect by transforming free radicals into less reactive compounds (Azzi et al.,1998; Naito et al., 2005). Vit E could easily pass through the placenta (Hidiroglu et al., 2001). Vit E, which is a powerful antioxidant for several tissues (Erdemli et al., 2016; 2017).

The effects of Acrylamide (AA) and Vitamin E (Vit E) on various rat tissues were investigated during pregnancy (days 0-20).

## MATERIAL AND METHODS

Ethics approval was obtained from Inönü University, Faculty of Medicine experimental animals ethics committee and young female rats that were procured from Inonu University, Faculty of Medicine, Experimental Animal Breeding and Research Center (İNÜTF-DEHÜM). The rats were taken into special cages at 17:00 hours, one male rat for every 2 female rats in each cage. They were kept in the same cage until 08:00 hours the next day. At the end of this period, the males were separated from the females. Female rat vaginal smears were examined under the microscope and the females whose smears exhibited sperm were accepted as half a day pregnant. Female rats who were not identified as pregnant were excluded from the study. Pregnant rats were kept in cages at 21 ± 2ºC in INUTF-DEHUM for 20 days (gestation period) under 12 hours of light and 12 hours of darkness and where continuous ventilation was provided. During the experiment the rats were fed ad-libitum. Before the experiment, Pregnant rats, whose pregnancies were identified as + with vaginal smear, were randomly distributed into groups of 6 pairs and the experiments were conducted between the 0th and 20th days of the pregnancy.

Tissues were taken out of the deep freeze and weighed on the day of the analysis.10% homogenate was created by adding phosphate buffer on the tissues and they were homogenized (IKA, Germany) at 12,000 rpm for 1-2 minutes on ice. Homogenate product malondialdehyde (MDA) levels were measured. Homogenate tissue samples were centrifuged at 5000 rpm at +4 degrees for 30 minutes to obtain supernatant. Obtained supernatants were tested for reduced glutathione (GSH), super oxide dismutase (SOD), catalase (CAT), Total Antioxidant Status (TAS), xanthine oxidase (X0), Total Oxidant Status (TOS), brain derived neurotrophic factor (BDNF) and protein levels. For histological analysis, tissue specimens were fixed under ambient temperature for 48 h with 10% neutral phosphate buffered formaldehyde. After fixation, kidney tissue specimens were passed through the ethanol and xylene series and then buried in paraffin blocks. Six micrometers sections were excised from the paraffin blocks and stained with hematoxylin–eosin (HE). All sections were examined by a histologist (blind) using a light microscope (Eclipse Ni-U) and camera (DS-Fi2) and the sections were analyzed with Image Analysis System (NIS-Elements Documentation 4.50) (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

## RESULTS AND DISCUSSION

A liberal amount of acrylamide (AA) is produced as a result of frying or baking foods in high temperatures, and individuals take certain amounts of AA everyday by consuming these food items. Pregnant women are also exposed to AA originating from food during pregnancy and their fetus are probably affected. The rats were divided into five different groups: control (C), corn oil (CO), vitamin E (Vit E), AA, and Vit E + AA, with eight pregnant rats in each group. On the 20th day of pregnancy, fetuses were removed and brain tissues of fetuses were examined for biochemical and histological changes. AA (5 mg/kg/bw) caused degeneration in neuron structures in fetal brain tissue and caused hemorrhagic damages; dramatically decreased brain-derived neurotrophic factor levels; increased malondialdehyde, total oxidant capacity levels; and decreased reduced glutathione and total antioxidant capacity levels ($p < 0.05$). On the other hand, it was determined that the Vit E (100 mg/kg/bw), a neuroprotectant and a powerful antioxidant, suppressed the effects of AA on fetal development and fetal brain tissue damage for the above-mentioned parameters ($p < 0.05$) Erdemli et al., 2016).

It was determined that acrylamide application during pregnancy statistically significantly increased MDA, TOS and XO levels and reduced GSH and TAS levels in the placenta tissue of pregnant rats when compared to all other groups, and GAS and TAS levels statistically significantly increased in vitamin E administered group when compared to all other groups and TOS and XO levels were decreased to control group levels. It was observed that orally administered AA changed the antioxidant / oxidant equilibrium favoring the oxidants by increasing MDA, XO and TOS levels in pregnant rats and caused oxidative stress, while vitamin E administration returned the antioxidant / oxidant equilibrium back to normal levels, preventing oxidative stress induced toxicity (Erdemli et al., 2017). Acrylamide administered during pregnancy increased MDA, TOS, XO levels statistically significantly and decreased the GSH level ($p \leq 0.05$) in the pregnant rat liver tissue when compared to all other groups. In the vitamin E administered group; GSH, TAS levels significantly increased statistically and TOS and XO levels dropped to levels of the control group ($p \leq 0.05$), in comparison to all other groups. Among all groups, no biochemical changes were observed in the fetus liver tissue ($p \leq 0.05$). The liver of pregnant rats functions as a protective pre-filter by detoxifying acrylamide

effectively and the acrylamide that reaches fetus liver is detoxified by the cytochrome P-450 system of the fetus liver. To be able to figure out the biochemical mechanism, more advanced studies are needed (Erdemli et al., 2017). It was determined that acrylamide (10 mg/kg/bw) , administered during pregnancy, statistically significantly increased MDA and TOS levels, maternal serum urea, creatinine, and Zn levels, while it decreased GSH, TAS, SOD, and CAT levels ($p \leq 0.05$) when compared with all other groups in the kidney tissues of pregnant rats and their fetuses and caused tubular degeneration, hemorrhage, narrowing, and closure in Bowman's space, and, in the E vitamin group, it statistically significantly increased GSH, TAS, SOD, CAT, urea, creatinine, and Zn levels when compared with other groups and lowered TOS and MDA levels to those of the control group ($p \leq .05$) and there were no differences between the groups histologically. It was observed that acrylamide administered during pregnancy caused oxidative stress in kidney tissues of mother rats and their fetuses, resulting in tissue damage, and vitamin E application, which is considered to be a powerful antioxidant, inhibited oxidative stress (Erdemli et al., 2019).

## CONCLUSION

Oral acrylamide intake has been observed by shifting the antioxidant / oxidant balance in favor of oxidants, leading to toxicity causing oxidative stress in the tissues of the mother and fetus rats. Vitamin E administration has been observed to prevent oxidative stress-induced toxicity by normalizing the antioxidant/ oxidant balance through detoxification. If it is considered that it is impossible to prevent exposure to AA toxicity in maternal and infant health, we recommend consuming sufficient amounts of fresh vegetables and fruits with high antioxidant properties, especially vitamin E, on a daily basis.

## Referencess

Allam A, El-Ghareeb AA, Abdul-Hamid M, Baikry A, Sabri MI 2011. Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: biochemical and morphological studies. Toxicol Ind Health, 27(4): 291–306.

Azzi A, Aratri E, Boscoboinik D, Clément S, Ozer NK, Ricciarelli R, Spycher S 1998. Molecular basis of a-tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. Biofactors, 7(1–2):3–14.

Bjellaas T, Olesen PT, Frandsen H, Haugen M, Stølen LH, Paulsen JE, Alexander J, Lundanes E, Becher G 2007. Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. Toxicol Sci, 98: 110–117.

Dybing E, Farmer P, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SP, Müller DJ, Olin S, Petersen BJ, Schlatter J, Scholz G, Scimeca JA, Slimani N, Törnqvist M, Tuijtelaars S, Verger P 2005. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. Food Chem Toxicol, 43: 365–410.

El-Sayyad HI, El-Gammal HL, Habak LA, Abdel-Galil HM, Fernando A, Gaur RL, Ouhtit A 2011. Structural and ultrastructural evidence of neurotoxic effects of fried potato chips on rat postnatal development. Nutrition,27(10):1066–1075.

Erdemli ME, Turkoz Y, Altinoz E, Elibol E, Dogan Z 2016. Investigation of the effects of acrylamide applied during pregnancy on fetal brain development in rats and protective role of the vitamin E. Human and Experimental Toxicology, 35(12): 1337–1344.

Erdemli ME, Altınöz E, Aksungur Z, Doğan Z, Gözükara Bağ H, Türköz Y 2017. Gebe Ratlara uygulanan Akrilamid ve E Vitaminin Plasenta Dokusu Üzerine Olası Etkilerinin Araştırılması. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5(4): 349-352.

Erdemli ME, Altinoz E, Aksungur Z, Turkoz Y, Dogan Z, Gozukara Bag H 2017. Biochemical investigation of the toxic effects of acrylamide administration during pregnancy on the liver of mother and fetus and the protective role of vitamin E. J Matern Fetal Neonatal Med, 30(7):844–848.

Erdemli ME, Aksungur Z, Gul M, Yigitcan B, Gozukara Bag H, Altinoz E, Turkoz Y 2019. The effects of acrylamide and vitamin E on kidneys in pregnancy: an experimental study. J Matern Fetal Neonatal Med, 32 (22): 3747–3756.

Exon JH 2006. A review of the toxicology of acrylamide. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 9(5):397–412.

Hidiroglou N, Madere R, McDowell L 2001. Maternal transfer of vitamin E to fetal and neonatal guinea pigsutilizing a stable isotopic technique. Nutr Res, 21(5):771–783.

International Agency for Research on Cancer (IARC) 1997. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some industrial chemicals. Geneva, Switzerland, 60: 389–433.

Lingnert H, Grivas S, Ja¨gerstad M, Törnqvist M, Åman P 2002. Acrylamide in food: mechanism of formation and influencing factors during heating of foods. Scand J Nutr, 46: 159–172.

Muralidhara SNP 2014. Mitigation of acrylamide-induced behavioral deficits, oxidative impairments and neurotoxicity by oral supplements of geraniol (a monoterpene) in a rat model. Chem-Biol Interact: 223:27–37

Naito Y, Shimozawa M, Kuroda M, Nakabe N, Manabe H, Katada K, Kokura S, Ichikawa H, Yoshida N, Noguchi N, Yoshikawa T 2005. Tocotrienols reduce 25-hydroxycholesterol-induced monocyteendothelial cell interaction by inhibiting the surface expression of adhesion molecules. Atherosclerosis,180(1):19–25.

Parzefall W 2008. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. Food Chem Toxicol, 46(4):1360–1364.

Sickles D, Goldstein B 1985. Acrylamide produces a direct, dosedependent and specific inhibition of oxidative metabolism in motoneurons. Neurotoxicology,7:187–195.

Spencer PS, Sabri MI, Schaumburg HH, Moore CL1979. Does a defect of energy metabolism in the nerve fiber underlie axonal degeneration in polyneuropathies? Ann Neurol, 5:501–507.

Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S,Törnqvist M 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. J Agric Food Chem, 50(17):4998–5006.

# Zeytin Yaprağı Metanol Ekstresinin *Escherichia coli* O157:H7 ve *Candida albicans* ATCC 10231'e karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Meltem Aşan-Özüsağlam*, Songül Tacer, Feride Çetin

Aksaray Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü, Aksaray, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: meltemozusaglam@gmail.com

## Özet

Bu çalışmada, Manisa'da yetişen Trilye çeşidi zeytin yaprağından elde edilen metanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi, gıda kaynaklı patojen *Escherichia coli* O157:H7 ve klinik kökenli fungal patojen *Candida albicans* ATCC 10231'e karşı araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite disk difüzyon, mikrodilüsyon ve makro-dilüsyon yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Zeytin yaprağı ekstresinin inhibisyon zon çapları *E. coli* O157: H7'ye karşı 9.42 mm ve *C. albicans* ATCC 10231'e karşı 19.42 mm olarak gözlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstresinin *E. coli* O157:H7 ve *C. albicans* ATCC 10231 üzerinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) ve Minimal Bakterisidal/Fungusidal Konsantrasyonu 10 mg/mL ve 20 mg/mL olarak belirlenmiştir. Makro-dilüsyon yönteminden elde edilen veriler, 20 ve 50 mg/mL konsantrasyonundaki ekstrenin, patojenik test mikroorganizmalarının büyümesi üzerinde engelleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, Manisa'dan toplanan Trilye çeşidi zeytin yaprağı metonol ekstresinin tıp ve ilaç endüstrilerinin yanı sıra gıda endüstrisinde de doğal bir antimikrobiyal katkı maddesi olarak kullanılabilme potansiyeli taşıdığını göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Antibakteriyel, antifungal, zeytin yaprağı, metanol ekstresi

## Investigation of Methonolic Extract from Olive Leaves against *Escherichia coli* O157:H7 and *Candida albicans* ATCC 10231

## Abstract

In this study, antimicrobial activity of metanolic extract from Trilye variety olive leaf which is grown in Manisa was investigated against food borne pathogen *Escherichia coli* O157:H7 and clinical fungal pathogen *Candida albicans* ATCC 10231. The antimicrobial activity was evaluated using disc diffusion, micro-dilution and macro-dilution methods. The diameters of inhibition zones of the olive leaf extract were observed 9.42 mm against *E. coli* O157:H7 and 19.22 mm against *C. albicans* ATCC 10231. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimal Bactericidal/Fungicidal Concentration of olive leaves extract against *E. coli* O157:H7 and *C. albicans* ATCC 10231 was determined as 10 mg/mL and 20 mg/mL. The data obtained from the macro-dilution method indicated that at the concentration of 20 and 50 mg/mL extract had an inhibitory effect on the growth of test pathogenic microorganisms. The results showed that Trilye variety olive leaf methonolic extract obtained from Manisa had potential to be used in food industry as a natural antimicrobial additive as well as medicine and pharmaceutical industries.

**Keywords:** Antibacterial, antifungal, olive leaves, methanolic extract

## GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea L.*), Oleaceae (Zeytingiller) familyasının bir üyesi olup dünyada geniş yayılımına sahip olan bir bitkidir (Arslan ve ark., 2017). Zeytinin anavatanı Güney Asya ve Güneydoğu Anadolu Bölgesini içine alan yukarı Mezopotamya olduğu bildirilmektedir (Owen ve ark., 2000). Akdeniz iklimine sahip olan yerlerde yetişebilen zeytin herdem yeşil bir bitkidir. Ülkemizde ise zeytin yetiştiriciliği Marmara Bölgesi, Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgesi, Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz Bölgesi'nde yayılım göstermiştir (Pala ve ark., 2001). Yapılan çalışmalarda zeytin yaprağının antifungal, antibakteriyel, antioksidan, hipokolesterolemik, kardiyoprotektif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Ferreira ve ark., 2007). Ayrıca yaprağından elde edilen Oleuropein ve fenolik bileşiklerin virüslere, retrovirüslere, bakterilere, mayalara, mantarlara ve diğer parazitlere karşı antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu da rapor edilmiştir (Koutsoumanis ve ark., 1998). Zeytin yapraklarının sahip olduğu biyolojik aktivitesinden dolayı gıdalarda katkı maddesi olarak kullanıldığında raf ömrünü uzatabilmektedir (Jemai ve ark., 2009; Boudhrioua ve ark., 2009; Bouaziz ve ark., 2010). Zeytin yaprak ekstrelerinin ayrıca enerji seviyelerini arttırmak, kan basıncını düşürmek ve kardiyovasküler ve bağışıklık sistemlerini desteklemek gibi sağlık yararları da bulunmaktadır (Covas, 2007;

El ve Karakaya, 2009). Günümüzde gıda ve klinik kökenli patojenlerin neden olduğu hastalıklar büyük sorun teşkil etmektedir. *Escherichia coli* O157:H7, kanlı ishal, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendromu salgınları ile karakterize edilen hastalık vakalarıyla sıklıkla ilişkili olan gıda kaynaklı bir patojendir (Riley ve ark., 1983; Remis ve ark., 1984). Candida türleri ise insanda en yaygın mantar patojenleri olup dünya çapında fırsatçı mantar enfeksiyonuna neden olmaktadır. Kandidiyaz da dahil olmak üzere mantar enfeksiyonları, özellikle immün yetmezliği olan hastalarda ciddi tehditler oluşturmaktadır (Singh, 2001; Yapar, 2014). *Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi Candida türleri, invaziv kandidiyazın % 90'ından sorumludur (Yapar, 2014, Sardi ve ark., 2013). *C. albicans*'ın dünya çapındaki klinik enfeksiyon sayısı son yıllarda önemli ölçüde artmakta ve geleneksel antifungal tedavilere dirençlilik gözlenmektedir (Lai ve ark., 2008). Ayrıca, ilaçla ilişkili toksisite, önemli ilaç etkileşimleri ve geleneksel antifungalların yetersiz yararlanımı nedenleri ile doğal ürünlerden yeni alternatiflerin araştırılması gerekmektedir (Cavaleiro ve ark., 2006). Bu çalışmamızda, Manisa'dan temin edilen Trilye çeşidi zeytin yaprağının metanol ekstresinin gıda kaynaklı bakteriyel *E. coli* O157:H7 ve klinik kökenli fungal *C. albicans* ATCC 10231 patojen mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal aktivitesi farklı yöntemlerle araştırılmış ve bu ekstrelerin gıda ve farmasötik alanda kullanım potansiyeli belirlenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Zeytin yaprağı örneklerinin temini

Zeytin yaprak örnekleri 4 Nisan 2019 tarihinde Türkiye'nin Manisa İli Karaoğlanlı Mahallesinden (38°32'02.9"N 27°34'42.3"E) Trilye çeşidi sofralık yeşil zeytinin yaprakları toplanmıştır.

### Zeytin yaprağı ekstrelerinin hazırlanması

Zeytin yaprakları açık havada kurutulup daha sonra toz haline getirilmiştir (Şekil 1A). 10 g toz haline getirilmiş zeytin yaprağı 50 mL metanol çözücüsü ile su banyosunda 4 saat süreyle ekstrakte edilmiştir (Şekil 1B). Ekstraksiyon ürünü süzüldükten sonra buharlaştırılmış ve elde edilen ekstre kullanılıncaya kadar 4° C'de muhafaza edilmiştir.




**Şekil 1.** Zeytin yaprağı ekstrelerinin hazırlanması
**(A)** Zeytin yapraklarının kurutulması
**(B)** Sıcak su banyosunda zeytin yapraklarından metanol ekstresinin hazırlanması

### Kullanılan test mikroorganizmaları

Gıda ve klinik kökenli test mikroorganizmalarının (*E. coli* O157:H7 ve *C. albicans* ATCC 10231) 24 saatlik aktif kültürleri kullanılmıştır.

## Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

### *Disk difüzyon yöntemi*

Zeytin yaprağı metanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Test mikroorganizmaları olarak *E. coli* O157:H7 ve *C. albicans* ATCC10231 kullanılmıştır. *E. coli* O157:H7 Nutrient/agar ve *C. albicans* ATCC 10231 YPD/agar besi yerinde 37°C ve 30°C'lerde kültürleri yapılmıştır. Test mikroorganizmaları serum fizyolojik ile iki defa yıkandıktan sonra konsantrasyonları 0.5 McFarland'a ayarlanmış ve daha sonrasında katı besi yerine ekimleri yapılmıştır. Ekimi yapılan petrilere steril diskler yerleştirildikten sonra disklere 20 µL zeytin yaprağı metanol ekstresi damlatılmıştır. Petriler 24 saatte uygun sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafındaki zonlar kumpas ile ölçülerek kaydedilmiştir. Tüm deneyler iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

### *Minimal inhibisyon (MİK) ve bakterisidal/fungusidal (MBC/MFC) konsantrasyonlarının belirlenmesi*

Ekstrelerin MİK ve MBC/MFC değerleri her iki test mikroorganizmaya karşı mikro-dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstre ve besiyeri içeren her tüpe 0.5 McFarland konsantrasyonunda test mikroorganizmaları eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra karışımı içeren tüpler 24 saat uygun sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, sıvı besi yerinde gelişmenin olmadığı konsantrasyon MİK değerleri olarak kaydedilmiştir. Tüplerden örnekler alınarak spesifik agar besi yerine spot ekimleri yapılmış ve 24 saat uygun sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, katı besi ortamı üzerinde bakterilerin gelişimini önleyen ekstre konsantrasyonları MBC veya MFC değerleri olarak değerlendirilmiştir.

## Spektrofotometrik olarak antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

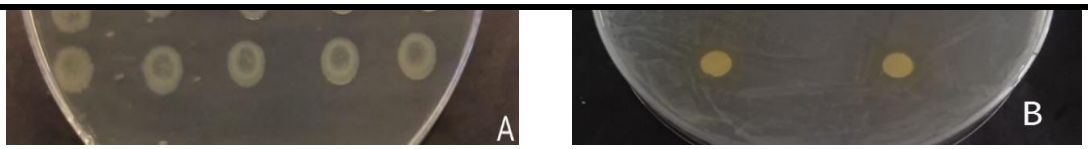
Zeytin yaprağı metanol ekstresinin spektrofotometrik olarak antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde makro-dilüsyon tekniği kullanılmıştır. *E. coli* O157:H7 ve *C. albicans* ATCC 10231 test mikroorganizmalarının 0.5 McFarland konsantrasyonunda hazırlanmış süspansiyonlarına değişik konsantrasyonlarda (5-10-20-50 mg/mL) metanol ekstresi ilave edilmiştir. Kontrol grubu olarak ekstre ilave edilmemiş hücre süspansiyonu kullanılmıştır. *E. coli* O157:H7 37°C'de ve *C. albicans* ATCC 10231 30°C'de inkübe edilmiştir. Mikroorganizma gelişimi inkübasyonun 0, 4, 8, 24 ve 48. saatlerinde spektrofotometre (Beckman Coulter) ile OD 540 nm'de belirlenmiştir. Tüm ölçümler iki tekerrürlü ve aseptik koşullarda yapılmıştır (Sousa ve ark., 2006).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Zeytin yaprağı metanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi, disk difüzyon, mikro-dilüsyon ve makro-dilüsyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Disk difüzyon sonuçlarına göre, zeytin yaprağı metanol ekstresinin *E. coli* O157:H7 ve *C. albicans* ATCC 10231 test mikroorganizmaları üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları 9.42-19.22 mm olarak kaydedilmiştir (Tablo 1, Şekil 2 ve 3). Metanol ekstresinin MİK ve MFC/MBC değerleri *E. coli* O157:H7 ve *C.albicans* ATCC 10231 için 10 ve 20 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Disk difüzyon sonuçları değerlendirildiğinde zeytin yaprağı metanol ekstresinin *C. albicans* ATCC 10231 üzerinde daha yüksek inhibisyon zon çapı oluşturduğundan *E. coli* O157:H7'e kıyasla daha fazla antimkrobiyal aktivite göstermiştir. Ancak metanol ekstresinin MİK ve MBC/MFC değerleri her iki test mikroorganizması için aynı çıkması mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal aktivitenin benzer düzeyde olduğuna işaret etmiştir. Makro-dilüsyon yöntemiyle elde edilen veriler değerlendirildiğinde ise kontrol grubuna kıyasla genellikle 20 ve 50 mg/mL ekstre konsantrasyonun test mikroorganizmalarının gelişimi üzerinde engelleyici etkisi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4 ve 5).

**Tablo 1**. Zeytin yaprağının antimikrobiyal aktivitesi

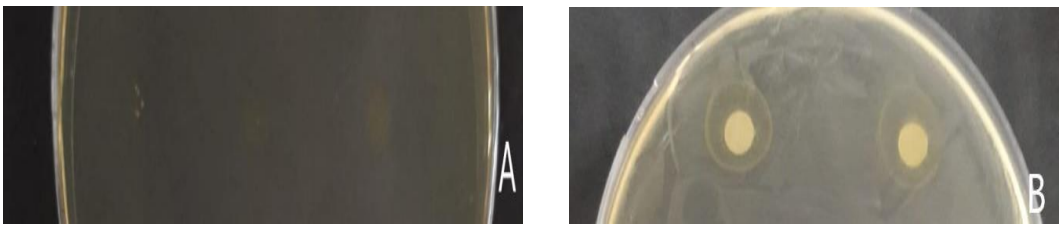
| | **İnhibisyon zon çapı (mm)** | | **MIK (mg/mL)** | | **MBC/MFC (mg/mL)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***E. coli* O157:H7** | ***C. albicans* ATCC 10231** | ***E. coli* O157:H7** | ***C. albicans* ATCC 10231** | ***E. coli* O157:H7** | ***C. albicans* ATCC 10231** |
| **Metanol ekstresi** | 9.42±0.02 | 19.22± 0.72 | 10 | 10 | 20 | 20 |




**Şekil 2.** Zeytin yaprağı metanol ekstresinin *E. coli* O157:H7 üzerinde antimikrobiyal aktivitesi

**(A)** Metanol ekstresinin disk difüzyon sonuçları

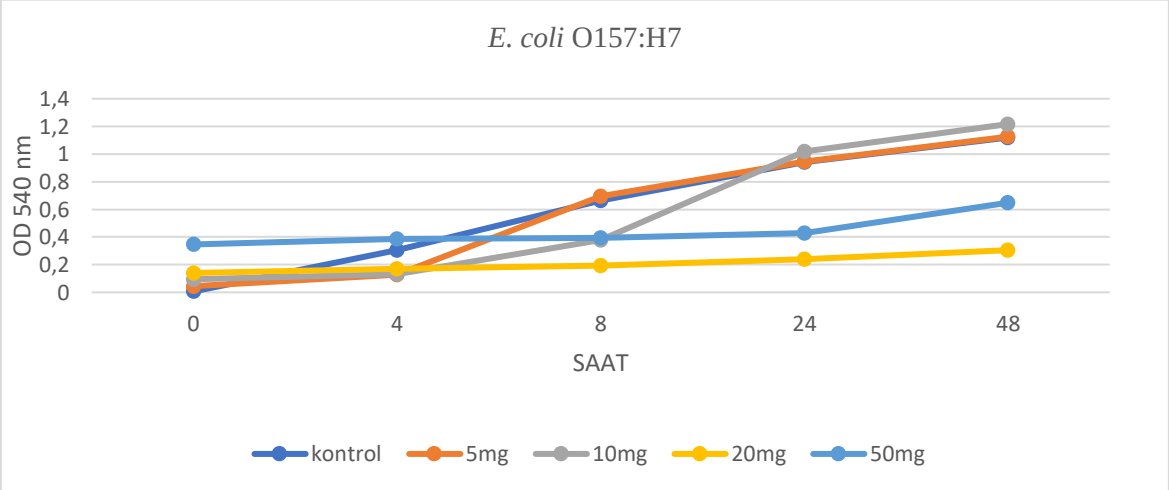
**(B)** Metanol ekstresinin MBC sonuçları



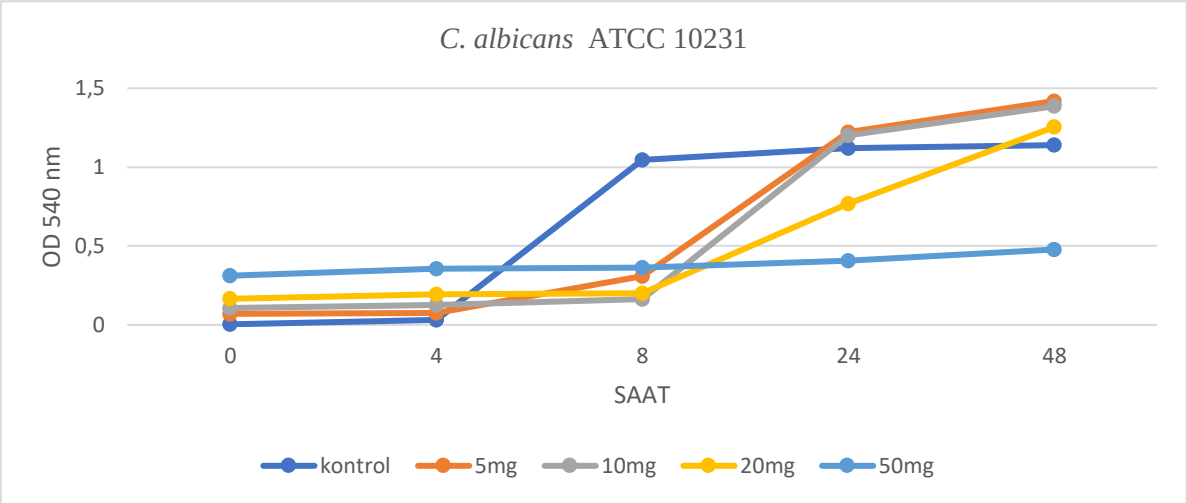

**Şekil 3.** Zeytin yaprağı metanol ekstresinin *C.albicans* ATCC 10231 üzerinde antimikrobiyal aktivitesi

**(A)** Metanol ekstresinin disk difüzyon sonuçları

**(B)** Metanol ekstresinin MBC sonuçları




**Şekil 4.** Zeytin yaprağı metanol ekstresinin inkübasyon sürecinde *E.coli* O157:H7'nin gelişimi üzerindeki etkisi




**Şekil 5.** Zeytin yaprağı metanol ekstresinin inkübasyon sürecinde *C. albicans* ATCC 10231'in gelişimi üzerindeki etkisi

Yapılan bir çalışmada, piyasadan temin ettikleri ticari zeytin yaprağı ekstresinin farklı bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Ekstrenin (15 µg) *E. coli* O157:H7 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapı 17.67 mm olarak bildirilmiştir. MİK değerini ise *E. coli* O157:H7 için ≥32 mg/mL olarak tespit etmişlerdir (Gökmen ve ark., 2014). Liu ve ark. (2017) ise ticari olarak temin ettikleri zeytin yaprağı ekstresinin 62.5 mg/mL konsantrasyonunun *E. coli* O157:H7'nin büyümesini neredeyse tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Yapılan benzer bir çalışmada, zeytin yaprağı su ekstresinin 5 mg'lık konsantrasyonun *E. coli*'nin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında kontrol grubuna göre zamanla bakterinin gelişiminde azalma seyretmiştir. *C. albicans* gelişimi 48 saatlik inkübasyondan sonra 5 mg konsantrasyonda aynı şekilde azalma görülmüştür (Pereira ve ark., 2007).

Birçok doğal üründe olduğu gibi coğrafi konum, bitki beslenmesi ve çeşit gibi farklılıklar nedeniyle ekstrelerin kompozisyonu değişebilmekte ve bu durum da antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili olabilmektedir. Ayrıca bitkilerin toplanma alanlarının farklı toprak oluşumundan dolayı antimikrobiyal aktiviteyi etkilediği de öne sürülmektedir (Pereira ve ark., 2006; Sousa ve ark., 2006). Zeytin yapraklarının kullanımı hipoglisemik ve hipokolesterolemik etkileri nedenleriyle araştırılmış ve zeytin yaprak esktreleri eczanelerde ve sağlık sektörlerinde bu amaçlarla kullanımı mevcuttur (Gonzalez ve ark., 1992).

## SONUÇ

Ülkemizden temin (Manisa ili) edilen Trilye çeşidi zeytin yapraklarının metanol ekstresinin test mikroorganizmaları *E. coli* O157:H7 ve *C. albicans* 10231'e karşı oldukça iyi antimikrobiyal aktivitesi gösterdiği değişik yöntemlerle tespit edilmiştir. Zeytinin herdem yeşil bir bitki olması ve yapraklarının gıda ve sağlık sektörlerindeki etkileri nedeniyle yaprakları antimikrobiyal ajanlar olarak kullanım potansiyeli taşımaktadır. Bir bitkinin antimikrobiyal aktivitesi üzerinde çeşidi, coğrafik konumu ve toprak özellikleri vb. birçok faktör etkili olabildiğinden her bir bitkisel kaynağın farklı aktiviteler göstermesi mümkündür. Manisa ilinden temin edilen Trilye çeşidi yaprak ekstresi, günümüzde var olan ilaçlara alternatif olarak bitkisel içerikli yeni ilaçların ve gıda ve farmasötik alanlarında daha etkili formülasyonların geliştirilmesine de katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

Arslan-Karaboğa AK, Öztürk E, Yerer MB, Koşar M 2017. Zeytin Yaprağındaki Oleuropein ve Farmokolojik Etkileri. Sağlık Bilimleri Dergisi, 26: 89-93.

Bouaziz M and Sayadi S 2005. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree, European Journal of Lipid Science and Technology 107(7-8); 497-504.

Boudhrioua N, Bahloul N, Slımen, BI, Kechaou N 2009. Comparison on the Total phenol Contents and The Color of Fresh and Infrared Dried Olive Leaves. Industrial Crops and Products, 29: 412-419.

Cavaleiro C, Pinto E, Gonçalves MJ, Salgueiro L 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. Journal of Applied Microbiology, 100:1333-1338.

Covas, M. I. (2007). Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* 55, 175–186. doi: 10.1016/j.phrs.2007.01.010

El SN Karakaya S 2009. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr. Rev.*, 67: 632–638. doi: 10.1111/j.1753-4887

Ferreire ICFR., Barros L, Soares ME, Bastos ML, Pereira JA 2007. Antioxidant Activity and Phenolic Contents of *Olea europaea* L. Leaves Sprayed with Different Copper Formulations. Food Chemistry, 103, 188-195.

Gökmen M, Kara R, Akkaya L, Torlak E, Önen A 2014. Evaluation of antimicrobial activity in olive (*Olea europaea*) leaf extract. American Journal of Microbiology, 5(2): 37-40.

Gonzalez M, Zarzuelo A, Gamez MJ, Utrilla MP, Jimenez J, Osuna I 1992. Hypoglycemic activity of olive leaf. Planta Med., 58: 513–5.

Jemai H, El Feki A, Sayadi S 2009. Anti diabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabeticrats, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(19): 8798-8804.

Koutsoumanis K, Tassou CC, Taoukis PS, Nychas GJ 1998. Modelling the efectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteriditis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. Journal of Applied Microbiology, 84: 981-987.

Lai CC, Tan CK, Huang YT, Shao PL, Hsueh PR 2008. Current challenges in the management of invasive fungal infections. J Infect Chemother, 14:77-85.

Liu Y, McKeever LC, Malik NS 2017. Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract agains foodborne bacterial pathogens. Frontiers in Microbiology, 8: 113.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spigelhalder B, Bartsch H 2000. Olive-Oil Consumption and Health: The Possible Role of Antioxidants. The Lancet Oncology, 1 (2): 107-112

Pala Y, Nogay A, Damgacı E A, Altın M 2001. Zeytin Bahçelerinde Entegre Mücadele Teknik Talimatı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı http://www.tagem.gov.tr/20web/YAYINLAR/ZEYTİN/10.html

Pereira J A, Pereira APG, Ferreira ICFR, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L Bento A 2006. Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. J. AgricFoodChem., 54 (22): 8425-8431.

Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive *(Oleaeuropaea L. Cv. Cobrançosa*) Leaves. Molecules, 12: 1153-1162.

Remis RS, MacDonald KL, Riley LW, Puhr ND, Wells, JG, Davis BR, Blake PA, Cohen ML 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. Annals of Internal Medicine, 101: 624–626.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML 1983. Hemorrhagic colitisassociated with a rareEscherichia coliserotype. The New England Journal of Medicine, 308: 681–685.

Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS 2013. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol., 62:10–24.

Singh N 2001. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. Clin Infect Dis., 33:1692-1696.

Sousa A, Ferreira ICFR, Calhelha R, Andrade PB, Valentão P, Bento A, Pereira JA 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives Alcaparra. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14: 8533-8538.

Yapar N 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Ther Clin Risk Manag., 10: 95–105.

# Characterization and migration from an Epoxy coating to foodstuffs

Zineb Kadri[1*], Souad Zyade[2]

[*1] Laboratoire LIPE, ESTC, Génie des procédés, Casablanca, Maroc.
[2] Laboratoire RAMTEX, ESITH, Chimie et valorisation, Casablanca, Maroc.

*Corresponding author e-mail: kadrizineb@live.fr

## Abstract

In the present study, we report many technics to characterize an Epoxy coating developed in our laboratory using selective raw materials. Such as; X-Ray Diffraction, Infra-red, differential thermal analysis and thermo gravimetric analysis, this Epoxy coating is intended to come in contact with foodstuffs.
The test with infrared of the epoxy film showed the presence of a bung of high intensity at about 1200 cm -1 relevant to the presence of a CO and CC bond, showing that it is indeed an epoxy structure. The results of DTA prove that this kind of coating present the same characteristic in different temperatures.
The chemicals migrants can interact with the food contacting the Epoxy, which can lead to the formation of hazardous substances that will be present in the food and can impact human health.
In this aim we have also used a several tests of migration (overall and specific), then the results were compared with the tolerate limits defined on the Regulation (EC) N°1935/2004 and the Moroccan standard N.M 11.4.006.

**Keywords**: Epoxy coating, Global migration, Specific migration, Food contact.

## INTRODUCTION

Food comes into contact with many materials and articles during its production, processing and storage, before its eventual consumption. Such materials and articles are called Food Contact Materials (FCMs). This includes direct or indirect contact.
FCMs should be sufficiently inert so that their constituents neither adversely affect consumer health nor impact the quality of the food. To ensure the safety of FCMs, and to facilitate the free movement of goods, European Union (EU) [1] law provides for binding rules that business operators must comply with.
The regulation (EC) N°19355/2004 [2] provides a harmonized legal EU framework; it sets on the general principals of safety and inertness for all food contact material,
The principals set out in regulation (EC) N°1935/2004 [2] requires that materials do not:

- Release their constituents into food at levels harmful to human health,
- Change food composition, taste and odor in an unacceptable way,

Chemical migrants can interact with the food contacting the FCM. This can lead to the formation of hazardous substances, which will be present in the food, and can be considered contaminants. For exemple; the migration of benzoic acid from PET into soft drinks containing vitamin C. Due to the reaction between the migrant and ascorbic acid, benzene is formed (Van Poucke et al.,2008) [3]. Therefore, it is essential that the final use for any given FCM is known when migration is assessed.
Coatings and varnishes are a group of materials for which the Commission may adopt specific measures. However, to date, the use of coatings and varnishes has not been subject to specific measures at the European level [4].
The aim of this work is to contribute to develop a new formulation in order to prepare an Epoxy coating able to come in contact with foodstuffs, thus our studies based on a selective choice of raw materials that respect the international regulation of food contact.
However, we are more interested in migration of an epoxy coating coming into contact with food.
Two different types of migration are distinguished: overall migration and specific migration:

- **Overall migration**: Global migrations only assess the overall mass of lost migrants without distinguishing the nature and specificity of these migrants;
- **Specific migration** which on the contrary tries to qualify and identify each of these elements;

## MATERIALS AND METHODS

### *II.1 FT-IR SPECTRA:*

Fourier Transform Infrared Spectroscopy is based on the absorption of infrared radiation by the film of epoxy analyzed. It allows, via the detection of the characteristic vibrations of chemical bonds, perform the analysis of the chemical functions present in our coating.

The infrared spectra were recorded on a Nicolet Is10 FTIR-ATR spectrophotometer.

### *II.2 X RAY DIFFRACTION:*

X ray diffraction (XRD) were performed with a BRUKER powder diffractometer, using Cu Kα radiation at room temperature and 40 mA in 5- 80°C 2θ range with a scan step of 0,059°.

The X-ray beams produced by the tube are sent onto the epoxy film in which they are deflected by the atoms. These diffracted beams interfere with each other, leading to the production of an intense signal in certain specific areas of space.[8]

### *II.3 DIFFERENTIAL THERMAL ANALYSIS (DTA) AND THERMAL GRAVIMETRIC ANALYSIS (TGA):*

Differential thermal analysis and thermo gravimetric analysis (TGa 60 H SHIMADZU) scans were carried out using about 20 mg of powder in platinum crucible and heating in 20- 120°C temperature range at the rate of 2.5°C/min.

### *II.4 OVERALL MIGRATION:*

The overall migration test is to determine the quantity of substance that may migrate from the epoxy paint film to the foodstuffs. However, it is not always possible to use all the foodstuffs for testing[**9**], food simulants are therefore introduced by the Moroccan standard N.M 11.4.006[9], aqueous food are simulated by distilled water, acetic acid and ethanol.

The Moroccan standard N.M 11.4.006 specifies the basic rules for determining the migration of plastic constituents intended to come into contact with foodstuffs. The principle of this method is to place the known surface materials in contact with a stimulant selected according to the nature of the food product with which it will be in contact, under well-defined experimental conditions (temperature and time).

For this purpose there are two types of simulant:

Non-fat simulant case:

The simulant or solvent is evaporated and the residue is weighed.[9]

Case of fat simulants:

The absorbed oil is extracted with sample, added to the simulant and the whole is weighed, the result is expressed in mg / dm 2.[9]

In this study we are mainly interested in non-fat foods.

## 3. Results and discussion:

### 3.1 FI-IR SPECTRA:

The infrared spectrum of the epoxy film is shown in the figure 9; we have established the allocation of the different absorption bands, and we deduced the following points:

- 2900-2830 cm-1 "medium intensity" double peak band indicates Csp3-H elongation vibrations.
- 1650, 1600 cm-1 "Medium intensity" corresponds to several modes of elongation of the bonds C = C (sp2).
- 1400-1480 cm-1 double-peak band moderately intense corresponds to elongations in the plane of C-Hybrid Sp3 [C-H] bonds due to alkyl functions.
- 1200-1280 cm-1 high intensity band checks the presence of the C-O bond.
- 1050 and 1100 cm-1 high intensity band corresponds to the presence of C-C bonds in the molecule the order of 800 Cm-1.

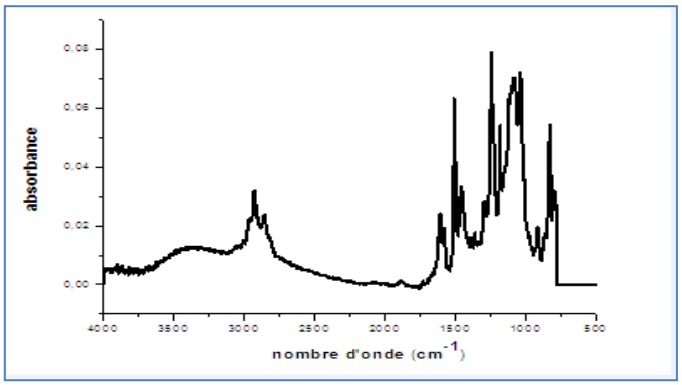



**Figure 9: FT-IR spectrum of the epoxy film.**

The presence of a high intensity band between 1200 and 1280 verifies the presence of the
C-O bond in the analyzed product, and the absence of a broad band indicates the presence of an OH bond in the order of 3400 cm -1, also the absence of a band on the spectrum indicates the presence of a group C = O, these readings gives a strong chance that the analyzed product is either an Epoxy;
Several authors have characterized epoxy-amine systems using Fourier transform infrared spectroscopy [13]. This technique has allowed several researchers [13] to study hydrogen bonds in epoxy-amine networks. These studies suggest the existence of many of these links in the networks, which persist over the glass transition (Tg) to the point of thermal decomposition. Bellenger et al. [14] and Williams et al. [14] show that the unbound hydroxyl absorption band at about 3600 cm-1 is hindered by the presence of a broad band of bound hydroxyls at 3600-3200 cm-1, attributed to hydrogen bond formation.

**X-Ray Diffraction:**

The characterization of Epoxy food contact by X-Ray Diffraction shows that the structure of this last is an amorphous structure; as describe the figure 10,

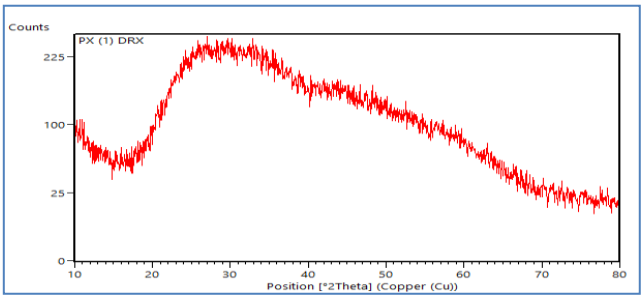



**Figure 10:X-Ray Diffraction curve of the epoxy film.**

Several studies from the theses of (NGUYN and Geoffrey Bouvet 2014) [15], have shown the influence of the microstructure of epoxy films on the migration phenomenon, indicating that the more amorphous the structure, the lower the diffusion, this observation obliges us to study more the morphology of our film in the next studies.

**Thermo gravimetric analysis (TGA)/ Differential thermal analysis (DTA):**

Thermo gravimetric analysis (TGA) consists of measuring the mass variation of the Epoxy film during a thermal cycle. [16].
The values obtained are derived from the evolution of the parameters of the sample compared to that of a reference used as an inert standard.
As described the Figure 11, the curve of Thermo gravimetric analysis shows that there is no loss of mass during the temperature range of 25 ° C to 130 ° C;

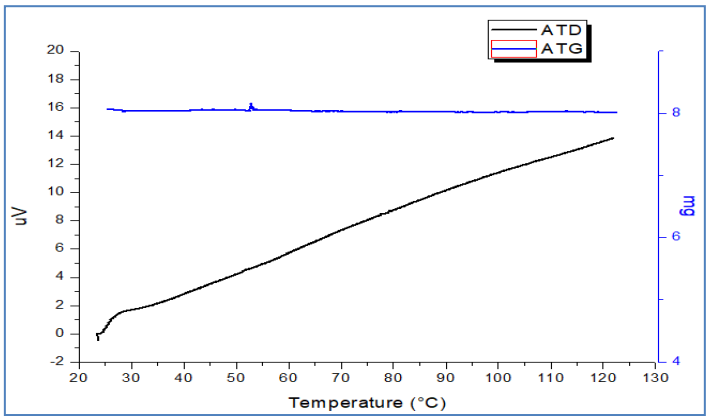



**Figure 11: Thermo gravimetric curve of epoxy film.**

Over the same temperature range (ThiHai Yen Qhach 2010)[17], performed thermal-gravimetric analyzes on a normal epoxy film and recorded a mass loss of 0.72% between 45 ° C and 130 ° C which is attributable to the evaporation of volatil organic compounds.

**OVERALL MIGRATION:**

The following table shows, the results of overall migration by total immersion for 10 days at 40°C of the Epoxy coating that we have prepared with different stimulant(water, ethyl alcohol and acetic acid);

| **Overall migration by immersion in the three simulants: (Water, ethyl alcohol, acetic acid)** | |
|---|---|
| Test condition during exposure to stimulants<br>* Temperature : 40 ° C<br>* Time: 10 days<br>Method of exposure of specimens: by immersion | |
| **SIMULANT AQUEOUS** | **MIGRANT QUANTITY ($mg/dm^2$)** |
| Water | 1.00 |
| 3% aceticacid solution | 1.21 |
| 15% ethylalcohol solution | 1.69 |

**Table 1: Results of Overall migration of -Epoxy coating food contact-**

According to the Moroccan standard the overall migration limit is 10mg/dm2 contact area[18], so those obtained results of the Epoxy that we have prepared to come in contact with food were found to be in compliance with the restriction,

Little study has been done on the migration of a food contact epoxy film (Scopus 2015)[19], but the legislation remains very concerned about human health and has set several regulations (EU 1935/2004)[1] for acceptable migration limits for food contact materials and also the list of tolerable substances for the manufacture of any object should be in contact with the foodstuff (positive list)[20].

**Conclusion:**

The overall migration results obtained of the samples in contact by total immersion with the epoxy film, were found to be in compliance with the restriction for the overall migration limit(<10mg/dm2) as defined in commission Regulation(EU) N°10/2011 for food contact materials for the tests under the above mentioned test conditions.

According to the results of global and specific migration and after several attempts and formulation we managed to prepare a food contact epoxy film, remains to study and characterize the migration of bisphenol A to complete this study.
Very little research has been done on the study of the migration of food contact materials (4118 articles on packaging, 1285 articles on food contact packaging versus only 120 articles on the migration of food contact materials) [24], so this study will serve as a basis for understanding and highlighting the need for the study of migration phenomenon for the safety of human health.

**REFERENCES**


- (Ulku Yilmazer, 2003).
- (Panel Geoffrey et al, 2014).
- (Thi Hai Yen Qhach., 2010).

Chapter from book Handbook of Applied Solid State Spectroscopy (pp.411-450) FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY.

Commission Regulation (EC) No 1895/2005 of 18 November 2005 on the restriction of use of certain epoxy derivatives in materials and articles intended to come into contact with food.

Commission Regulation (EC) No 2023/2006 of 22 December 2006 on good manufacturing practice for materials and articles intended to come into contact with food.

Cristina Bach. Evaluation de la migration des constituants de l'emballage en poly (éthylène téréphtalate) (PET) vers l'eau, des facteurs d'influence et du potentiel toxique des migrants. Matériaux. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. ffNNT : 2011INPL081Nff. fftel-01749435v2f

Determination of heavy metals by ICP-OES and F-AAS Journal of Hazardous Materials Barbara Feist Barbara Mikula, Katarzyna Pytla, kowska Bozena, Puzio Franciszek Buhl.2007.

European Commission, Commission Regulation (EC) No. 1895=2005 of 18 November 2005 on the restriction of use of certain epoxy derivatives in materials and articles intended to come into contact with food. Off. J. Eur. Union L302, 28.

European Commission, Commission Regulation (EC) No. 1895=2005 of 18 November 2005 on the restriction of use of certain epoxy derivatives in materials and articles intended to come into contact with food. Off. J. Eur. Union L302, 28.

European Commission, Corrigendum to Commission Directive 2002=72=EC of 6 August 2002 relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. Off. J. Eur. Communities L39, 1.

Fast fourier transform IR characterization of epoxy GY systems crosslinked with aliphatic and cycloaliphatic EH polyamine adducts, G Nikolic, S Zlatkovic, M Cakic, S Cakic, C Lacnjevac… - Sensors, 2010.

FOOD CONTACT LEGISLATION AND MIGRATION Sara Limbo, Associate Professor State University of Milan 2008.

Monitoring the Benzene Contents in Soft Drinks Using Headspace Gas Chromatography−Mass Spectrometry: A Survey of the Situation on the Belgian Market Article in Journal of Agricultural and Food Chemistry by Van Poucke et al.,2008.

Norme Code: NM 11.4.006 Emballages en matières plastiques Migration globale des constituants des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires Règles de base.

X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications *in* Critical Reviews in Analytical Chemistry 45(4) · April 2015.

Alam MS, Kaur G, Javed K, Athar M 2007. *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. Food and Chemical Toxicology, 45: 910-920.

Dawson SS, Michler CH 2014. Afforestation, restoration and regeneration - Not all trees are created equal. Journal of Forestry Research, 25(1): 3-20.

FAO, 2006. Global Forest Resources Assessment 2005, *FAO Forestry Paper* 147. Available at: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/a0400e [28.05.12]Ward PC, Mawdsley W 2000. Fire management in the borea

# Ankara Bölgesi'nde 2015 ve 2016 Yıllarında Çeşitli Gıdalardan Izole Ve Identifiye Edilen Gıda Patojenlerinin Ve Indikatör Bakterilerin Durumu

Sibel Kızıl[1*]

[*1]Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

*sibelozkok@hotmail.com

## Özet

Bu çalışmada amaç, Ankara Bölgesi'nde toplanan çeşitli gıdalardan Türk Gıda Kodeksi'ne göre yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda tespit edilen bakterilerin durumunu araştırmaktır. Pazarlardan, marketlerden toplanan çeşitli gıdaların patojen bakteriler yönünden analizi VIDAS UP cihazı ile; indikatör bakteriler yönünden analizleri ise TEMPO cihazı ile yapıldı. 2015 yılında yapılan analizler sonucunda % 9,3'ü *E. coli* O157, % 8,4'ü *E. coli*, % 24,2'si koagülaz pozitif Stafilokok, % 17,8'i koliform, % 10,2'si maya-küf ve % 1'i *Salmonella* spp., % 42,3'ü Aerobik Koloni Sayısı, % 13'ü *B. cereus* yönünden uygunsuz olarak tespit edilmiştir. 2016 yılında yapılan analizler % 7,9'u *E. coli* O157, % 8,5'i *E. coli*, % 9,2'si koagülaz pozitif Stafilokok, % 18,9'u koliform, % 3,4'ü maya-küf ve % 1,9'u *Salmonella* spp., % 0,4'ü *Listeria monocytogenes*, % 68,1'i Aerobik Koloni Sayısı, % 3,6'sı *B. cereus* yönünden uygunsuz olarak tespit edilmiştir. Genel olarak analizler incelendiğinde sırasıyla Aerobik Koloni Sayısı, koliform, koagülaz pozitif Stafilokoklar, *E. coli* her iki yılda da uygunsuz tespit edilen analizler olmuştur. Piyasada satılan gıdaların mikrobiyolojik analizlerine bakıldığında daha çok indikatör bakteriler yönünden, özellikle de Aerobik Koloni Sayısı, koliform, koagülaz pozitif Stafilokoklar, *E. coli* yönünden kontamine olduğu tespit edilmiştir. Patojenler bazında değerlendirildiğinde ise en sık *E. coli* O157'nin tespit edildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar ülkemizde gıda sektörünün en önemli sorunu olan "hijyen" yönünden halen yeterince istenilen düzeyde olmadığını göstermiştir. Bu çalışmada Ankara Bölgesi'nde birçok gıda mikrobiyolojik yönden ele alınmış, mikrobiyolojik açıdan riskli olan gıdalar ve risklerin hangi bakteriler olduğu bu çalışmada tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda, mikrobiyoloji, hijyen, patojenler, indikatör bakteriler

# The Status of Food Pathogens and Indicator Bacteria Isolated and Identified from Various Foods in 2015 and 2016 in Ankara Region

## Abstract

The aim of this study is to investigate the status of bacteria detected as a result of microbiological analysis made according to the Turkish Food Codex of various foods collected in the Ankara Region. Analysis of various foods collected from markets and markets for pathogenic bacteria with VIDAS UP device; the indicator bacteria were analyzed with the TEMPO device. As a result of the analyzes made in 2015, 9.3% *E. coli* O157, 8.4% *E. coli*, 24.2% coagulase positive *Staphylococcus*, 17.8% coliform, 10.2% yeast-mold and 1% *Salmonella* spp., 42.3% Aerobic Colony Number, 13% inconvenient in terms of *B. cereus*. Analysis conducted in 2016 7.9% *E. coli* O157, 8.5% *E. coli*, 9.2% coagulase positive *Staphylococcus*, 18.9% coliform, 3.4% yeast-mold and 1.9% *Salmonella* spp., 0.4% *Listeria monocytogenes*, 68.1% Aerobic Colony Number, 3.6% *B. cereus*. In general, when the analyzes were examined, Aerobic Colony Number, coliform, coagulase positive *Staphylococci*, and *E. coli* were found to be inappropriate in both years. Considering the microbiological analysis of the foods sold in the market, it was found that they were contaminated mostly in terms of indicator bacteria, especially Aerobic Colony Number, coliform, coagulase positive *Staphylococci* and *E. coli*. When evaluated on the basis of pathogens, it was determined that *E. coli* O157 was detected most frequently. These results showed that the "hygiene" aspect, which is the most important problem of the food sector in our country, is still not at the desired level. In this study, many foods in the Ankara Region were handled microbiologically, and microbiologically risky foods and bacteria were identified in this study.

**Keywords:** Food, microbiology, hygiene, pathogens, indicator bacteria

## GİRİŞ

Türk Gıda Kodeksi'nde, Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre gıdaların 25 gramında olmaması gereken patojenler ve belli bir sayıda olması gereken indikatör bakterilerin listeleri, analiz yöntemleri ve limit değerleri yer almaktadır. Gıda işletmecisi, üretim sonrasında nihai ürünlerinin burada belirlenen limitler içerinde olmasını garanti etmekle yükümlüdür. Bu sebeple de ürünlerinin tüm analizlerini yaptırdıktan sonra tüketime sunmaları gerekmektedir. Ancak ülkemizde bu analizlerin işletmeciler tarafından yapılmadığı, eksik yapıldığı, nihai ürünün ambalajının uygun olmaması gibi birçok nedenden ötürü gıdaların kriterlere uygun olmadığı görülmektedir.

Bursa'da 2005 yılında, çeşitli süper marketlerin soğuk olarak tüketime sunulan hazır gıda ürünlerinde mikrobiyolojik kalitelerinin düşük olduğu, gıda zehirlenmelerine neden olan *E. coli* ile koagülaz pozitif stafilokokları içermesi yönünden potansiyel halk sağlığı tehlikesi taşıdığı belirlenmiştir (Temelli ve ark., 2006).

Ankara'da 2013 yılında tüketime sunulan hazır gıdalar üzerinde yapılan bir çalışmada ürünlerin % 8'inin bir veya daha fazla parametre yönünden tüketime uygun olmadığı bildirilmiştir. Tüketime sunulan ve ısıtılarak servis edilen hazır yemeklerde *B. cereus,* Stafilokokkal enterotoksin ve sülfit indirgeyen anaerobik bakteri, soğuk servis edilen salata, meze ve üretim esnasında elle teması olan pişirilmiş unlu mamüllerde *E. coli* ve koagülaz pozitif stafilokoklar yönünden gıdaların risk taşıdığı tespit edilmiştir (Şenses-Ergül ve ark. 2015).

Açıkta satılan baharatlarda 2015 yılında yapılan bir çalışmada, *E. coli* O157:H7 saptanmazken, *Salmonella spp.* İstanbul'dan alınan bir karabiber örneğinde, İzmir'den alınan bir karabiber örneğinde ve Samsun'dan alınan 3 kırmızıbiber ve 2 sumak örneklerinde saptanmıştır (Kızıl ve ark., 2015).

Afyon'da 2006 yılında peynirlerde yapılan bir çalışmada, örneklerin % 6'sında *L. monocytogenes* ve % 2'sinde *Salmonella spp.* tespit edilmiştir.

İstanbul'da 2016 yılında yaş pastalarda yapılan bir çalışmada, % 1,6 *E. coli,* % 1,6 *S. aureus,* % 1,6 *L. monocytoges* tespit edildiği bildirilmiştir. *Salmonella* spp. tespit edilememiştir. Yine İstanbul'da 2018 yılında toplu yemek üretimi yapan bir firmadan alınan yemeklerde, *E. coli* O157:H7 tespit edilmemiş; %1 *Salmonella spp.*, % 15, 2 *B. cereus* tespit edilmiştir. 2014 yılında İstanbul'da salatalar üzerinde yapılan bir çalışmada, *Salmonella spp.*,'ye rastlanılmamış; *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* % 22,7 ve % 25 olarak tespit edilmiş, % 7, 22 *E. coli* saptanırken örneklerde fekal koliform ve *S. aureus* oranları yüksek oranda bulunmuştur (Tirsi, 2016).

Bursa'da 2017 yılında yapılan başka bir çalışmada, *S. aureus* ve toksinleri açısından riskli olabileceği düşünülen 4 yemekte (ızgara tavuk, köfte, sütlü tatlı ve rus salatası) % 13,8 *S. aureus,* % 19,4 Koliform, % 2,7 *E. coli* tespit edilmiştir. Rus salatasının en riskli gıda olduğu bildirilmiştir (Aslan, 2017).

Çiğ olarak tüketilen salataların 2019 yılında yapılan bir çalışma sonucunda, satın alma aşamasında marul, kıvırcık ve havucun maydanoza göre mikrobiyolojik yükünün daha çok olduğu, tüm örneklerde koliform bakteri ürediği, örneklerin yarısında da *S. aureus* ürediği bildirilmiştir (Erkoç, 2019).

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, Ankara Bölgesi'nde satışa sunulan değişik ürün gruplarından numuneler Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre mikrobiyolojik analize alındı. Pazarlardan, marketlerden toplanan çeşitli gıdaların patojen bakteriler yönünden analizi enzim-linked fluorescent immunoassay (VIDAS UP), indikatör bakteriler yönünden analizi, Kalite İndikatörleri Mikroorganizma Sayım Cihazı (TEMPO) ile yapıldı. VIDAS UP ile *Salmonella spp. L. monocytogenes, E. coli* O157:H7; TEMPO ile Aerobik koloni sayımı, *E. coli, Enterobacteriaceae*, Koliform, Koagülaz pozitif Stafilokok, *B. cereus,* maya-küf ve sülfit indirgeyen bakteriler yönünden analizleri yapıldı.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Çeşitli gıdaların yapılan mikrobiyolojik analizleri sonucunda 2015 yılında % 89'u kriterlere uygun, % 11'i uygun olmadığı; 2016 yılında % 95,1'inin uygun, % 4,9'unun uygun olmadığı tespit edilmiştir. Analizler incelendiğinde 2015 yılında sırasıyla en yüksek tespit edilen uygunsuzluk yüzdesi koagülaz pozitif Stafilokoklar, aerobik koloni sayımı, koliform, maya-küf, *E. coli* O157:H7, *B. cereus* ve *Salmonella* spp.; 2016 yılında ise aerobik koloni sayımı, koliform, koagülaz pozitif Stafilokoklar, *E. coli, E. coli* O157:H7, maya-küf ve *Salmonella* spp.'lerde görülmüştür. Dolayısıyla her iki yılda da indikatör bakteriler yönünden

çeşitli gıdaların kriterlerin üzerinde olduğu, daha düşük oranlarda da patojen bakterilerin tespit edildiği görülmüştür. İndikatör bakterilerin yüksek olduğu gıdalar incelendiğinde baharat, bakliyat, peynir, yoğurt, yufka, salata, türk kahvesi, anason ve sahlep gibi ürünlerin olduğu belirlenmiştir. Özellikle aerobik koloni sayımı yönünden kuyruk yağı ve gömlek yağının yüksek değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Patojen bakteriler içerisinde de en çok *E. coli* O157:H7'nin özellikle et ürünlerinde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1.'de 2015 yılında Tablo 2.'de 2016 yılında patojen ve indikatör bakterilerin tespit edildiği ürünler ve uygun olmayan analizlerin yüzdesi verilmiştir.

**Tablo 1.** 2015 yılında patojen ve indikatör bakterilerin tespit edildiği ürünler ve uygun olmayan analizlerin yüzdesi.

| Analiz | Uygun Olmayan Analiz Yüzdesi | Uygun Olmayan Ürünler |
|---|---|---|
| *Salmonella* spp. | 1 | Tatlı Toz Biber |
| | | Küşleme |
| *E. coli* O157 | 9 | Küşleme |
| | | İncik |
| | | Kuzu Bonfile |
| AKS | 11 | Kuyruk Yağı |
| | | Gömlek Yağı |
| KPS | 24 | Pastırma |
| | | Sumak |
| | | Tatlı Toz Biber |
| | | Köri |
| | | Kimyon |
| | | İsot |
| | | Pul Biber |
| | | Yenibahar |
| | | Karabiber |
| | | Kaymak |
| | | Sade Peynir |
| | | Peynir Kurusu |
| | | Koyun Peyniri |
| *E. coli* | 8 | Koyun yoğurdu |
| | | İnek yoğurdu |
| | | Manda yoğurdu |
| Koliform | 10 | Pirinç |
| | | Yufka |
| | | Buğday |
| Maya-Küf | 10 | Dut Ezmesi |
| | | Fıstık Ezmesi |
| | | Kuru Üzüm |
| | | Hurma |
| | | Buğday |
| | | Helva |
| | | İrmik Helvası |
| | | Kuru Biber |
| | | Kuru Patlıcan |
| *B. cereus* | 3 | Köri |
| | | Çemen Otu |
| | | Mozarella |

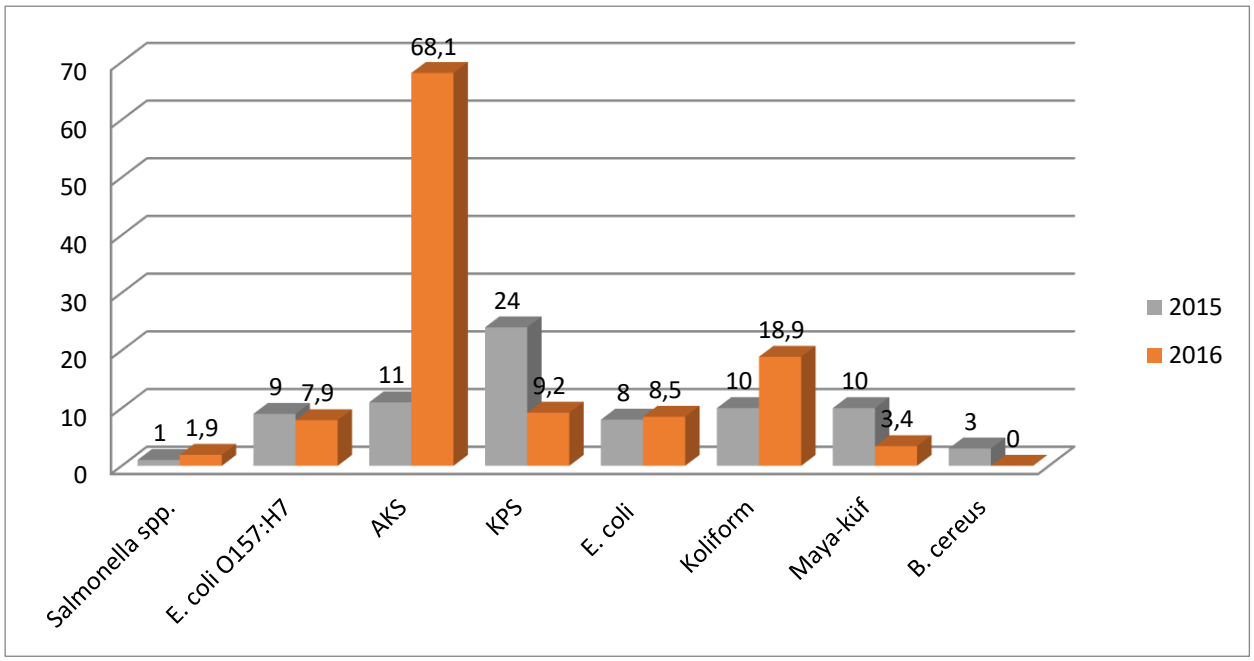
KPS: Koagülaz Pozitif Stapfilokok, AKS: Aerobik Koloni Sayımı

**Tablo 2.** 2016 yılında patojen ve indikatör bakterilerin tespit edildiği ürünler ve uygun olmayan analizlerin yüzdesi.

| Analiz | Uygun Olmayan Analiz Yüzdesi | Uygun Olmayan Ürünler |
|---|---|---|
| *Salmonella* spp. | 1,9 | Bıldırcın |
| | | Tavuk |
| | | Paça |
| | | Beyaz Peynir |
| | | Toz Biber |
| *E. coli* O157 | 7,9 | Dana Lop Et |
| | | Küşleme |
| | | Kuzu Kalem Pirzola |
| | | Paça |
| | | Sucuk |
| | | Uykuluk |
| AKS | 68,1 | Kuyruk Yağı |
| | | Gömlek Yağı |
| KPS | 9,2 | Keçi Peyniri |
| | | Kekik |
| | | Nane |
| | | Pastırma |
| | | Karabiber |
| | | Kimyon |
| *E. coli* | 8,5 | Kefir |
| | | Yoğurt |
| | | Salata |
| Koliform | 18,9 | Türk Kahvesi |
| | | Anason |
| | | Sahlep |
| | | Pirinç |
| | | Kişniş Tohumu |
| | | Rezene Tohumu |
| | | Siyez Bulgur |
| | | Yufka |
| Maya-Küf | 3,4 | Çeşitli gıdalar |

KPS: Koagülaz Pozitif Stapfilokok, AKS: Aerobik Koloni Sayımı

Şekil 1.'de 2015 ve 2016 yılında patojen ve indikatör bakterilerin tespit edildiği ürünler ve uygun olmayan analizlerin yüzdesi karşılaştırmalı olarak grafik şeklinde sunulmuştur.




**Şekil 1.** 2015-2016 yılları arasında gıdalardan tespit edilen patojen ve indikatör bakterileri yüzdesi

Kuyruk yağı ve gömlek yağında aerobik koloni sayımı oldukça yüksek tespit edilmektedir. Bu ürünler için hijyenik koşullarda kesim yapılması ve kesimin hemen ardından hijyenik koşullarda karkastan ayrılarak muhafaza edilmesi gerekmektedir.

Türk kahvesinde % 18 oranında koliform yönünden uygunsuzluk bulunmuş, yapılan detaylı çalışmalarda kahve makinelerinden kaynaklanan mikrobiyolojik kirlilik tespit edilmiştir. Makinalar iyice temizlendikten sonra çekirdeklerin öğütülmesi gerekmektedir.

Yılların karşılaştırılması yapıldığında patojenlerde farklılık görülmezken, aerobik koloni sayımı, *E. coli* ve koliform sayılarında artış; koagülaz pozitif Stafilokok, maya-küf, *B. cereus*'ta azalma tespit edilmiştir.

Gıda alanında yapılan çalışmalara bakıldığında çoğunlukla nihai ürün olan tüketime hazır gıdalarda mikrobiyolojik kriterlerin incelendiği görülmektedir. Bu çalışmada ise hazır yemekler değil çok fazla çeşitlilik gösteren gıdalarda mikrobiyolojik kriterler yönünden inceleme yapılmıştır. Araştırmanın sonucunda da özellikle direk olarak tüketilen baharatlarda mikrobiyolojik açıdan kirlilik tespit edilmiştir. Bunun yanında bakliyat, peynir, yoğurt, yufka, salata, türk kahvesi, anason ve sahlep gibi gıdalarda da mikrobiyolojik kriterler yönünden uygun olmayan ürünlerdir. Direkt olarak tüketilen peynir, yoğurt ve salata gibi ürünler halk sağlığı açısından riskli ürünlerdir. Türk kahvesi, anason ve sahlep gibi ürünler de mikrobiyolojik açıdan risk teşkil eden ürünlerdir.

Bu çalışmaya parallel olarak 2015 yılında açıkta satılan baharatlarda yapılan bir çalışmada, *Salmonella spp.* İstanbul'dan alınan bir karabiber, İzmir'den alınan bir karabiber ve Samsun'dan alınan 3 kırmızı biber ve 2 sumak örneğinde saptanmıştır (Kızıl ve ark., 2015).

Afyon'da 2006 yılında peynirlerde yapılan bir çalışmada (Akkaya, 2006), örneklerin % 2'sinde *Salmonella spp.* tespit edilirken, bu çalışmada da 2016 yılında beyaz peynirden *Salmonella* spp. tespit edilmiştir.

Çiğ olarak tüketilen salataların 2019 yılında yapılan bir çalışma sonucunda, satın alma aşamasında marul, kıvırcık ve havucun maydanoza göre mikrobiyolojik yükünün daha çok olduğu, tüm örneklerde koliform bakteri ürediği bildirilmiştir (Erkoç, 2019). Bu çalışmada da salatalar *E. coli* sayımı yönünden kriterlerin üzerinde tespit edilmiştir.

## SONUÇ

Bu sonuçlar ülkemizde gıda sektörünün en önemli sorunu olan "hijyen" yönünden halen yeterince istenilen düzeyde olmadığını göstermiştir. Bu çalışmada Ankara Bölgesi'nde birçok gıda mikrobiyolojik yönden ele alınmıştır. Mikrobiyolojik açıdan riskli olan gıdalar ve risklerin hangi bakteriler olduğu bu çalışmada tespit edilmiştir. Özellikle gıda işletmelerinde indikator bakterilerin sayılarının kriterlerin antında olması için "hijyen eğitimleri"nin sürekli olarak verilmesi, personelin bu konuda bilgili olması halk sağlığının korunması açısından çok büyük öneme sahiptir.

## KAYNAKLAR

Akkaya L, Alişarlı M 2006. Afyonkarahisar'da tüketime sunulan peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella spp*. varlığının belirlenmesi. YYÜ Vet. Fak. Derg. 17(1-2): 87-91.

Aslan Ö 2017. Hazır yemeklerin *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin içeriği açısından risk değerlendirilmesi. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi dergisi, 17: 34-40.

Erkoç Ö 2019. Çiğ olarak tüketilen bazı salata malzemelerinin mikrobiyolojik yönden incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.

Kızıl M, Wassouf N, Tengilimoğlu M, Gümüş D, Dikmen D, Uyar MF 2015. Açıkta satılan baharatlarda *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* spp. varlığının moleküler mikrobiyolojik analiz yöntemi ile belirlenmesi. Beslenme ve Diyetetik Dergisi, 43(3): 228-236.

Şenses-Ergül Ş, Sarı H., Ertaş S, Berberoğlu U, Cesaretli Y, ırmak H 2015. Tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 72 (3): 199- 208.

Temelli S, Sen C, Saltan Evrensel S, Yüksek N 2005. Soğuk olarak tüketime sunulan bazı hazır gıdaların mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi. Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med. 24(2005): 1-2-3-4: 69-74.

Tirsi S 2016. İstanbul'da tüketime sunulan yaş pastaların bazı patojen bakteriler yönünden incelenmesi ve mevsimlere göre karşılaştırılması. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.

# Identifying the Role of Speedy/RINGO on Mitogenic (MAPK) and Survival (AKT) Pathyways Interaction in Neuroblastoma Cells

Yesim Kaya, Seren Kucukvardar and Aysegul Yildiz[1*]

[*1]Mugla Sitki Kocman University, Faculty of Science, Molecular Biology and Genetics Department, Mugla, Turkey.

*Corresponding author e-mail: aysegulunal@mu.edu.tr

**Abstract**
Over-activation of mitogenic MAPK and AKT survival pathways is one of the most important contributing factors in the formation of many types of cancer, including neuroblastoma. This main causative factor also indicates a poor prognosis by causing chemotherapy resistance. This state demonstrates that there is a cross-talk between these two signaling cascades and they act together by one triggering the other, during cancer progression. Studies are performed with cell and tissue types other than neuroblastoma show that there is more likely a novel cell cycle regulator protein, Speedy/RINGO at the heart of this interaction. It has been shown that over-expression of some cell cycle regulators such as Speedy/RINGO causes cells to become cancerous and become aggressive by escaping them from apoptosis. Speedy/RINGO, is a cyclin like cell cycle regulator protein that binds and activates CDKs and has a functional role in G1/S transition. The aim of this study is to show the connective role of Speedy/RINGO in between AKT and MAPK pathways in neuroblastoma for the first time. In this direction, the MAPK pathway was inhibited by U0126, causing a decrease in the Speedy/RINGO expression level. Due to this decrease, CDK2-Cyclin A expression levels and AKT phosphorylation were declined. In the second part of the study, the Speedy/RINGO gene was silenced by the siRNA method to confirm that these effects were seen after MAPK inhibition depended on Speedy/RINGO. As a result, similar data were obtained as in MAPK inhibition. CDK2-Cyclin A and AKT expression levels decreased due to the silencing of the Speedy/RINGO.
**Keywords:** Neuroblastoma, MAPK, AKT, Speedy/RINGO, Cyclin A-CDK2

## INTRODUCTION

Neuroblastoma is the most common pediatric extracranial solid tumor which causes approximately 15% of cancer-related deaths in the pediatric population (Park et al., 2010). The most important characteristics of disease are spontaneous genetic alterations such as oncogenic activation, deregulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and survival Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase-B/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR or AKT) signaling pathways and chromosomal abnormalities (Kaneko et al., 1987; Tanaka et al., 1988). MAPK and AKT signaling pathways have important cellular functions that are activated via molecular changes in genes encoding the essential elements of these signaling pathways and the amplification or mutation of cell surface receptors (Schubbert et al., 2007; Courtney et al., 2010). Deregulation of these signaling pathways may lead to uncontrolled cell growth, survival; as a result, it causes oncogenic transformation and progression. Because of these properties, each member of MAPK and AKT signaling pathways are seen as important targets for therapeutic intervention in human cancers (De Luca et al., 2012). PI3K / Akt signaling pathway regulates basic cellular functions such as growth, proliferation, cellular metabolism, cell skeleton organization, survival and apoptosis in normal cells (Porta et al., 2014). Overactivation of the AKT signaling pathway may result in poor prognosis in patients with neuroblastoma cancer (Opel et al., 2007). As a result, this has been associated with an increase in cell survival and increased resistance to chemotherapy in neuroblastoma (Boller et al., 2008; Li and Thiele, 2007). Therefore, targeting the AKT signaling pathway with appropriate inhibitors appears to be a promising strategy for overcoming therapeutic resistance. (Paz-Ares et al., 2009). Another signaling pathway that has an important role in tumor formation and resistance to anti-cancer therapies, such as the AKT signaling pathway, is the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway (Kolch, 2000). The MAPK is one of the highly conserved signaling pathway within the cell that allows cells to respond to environmental stimuli and stress. The signal generated by the received stimuli is primarily transferred to the small oncogenic G-protein Ras and then to the Raf (MEK

Kinase) protein, which in turn activates MEK 1/2 (MAPK / ERK Kinase or MAP Kinase Kinase) signaling proteins. The active MEK1/2 activates ERK1/2 by phosphorylation and controls cellular events such as differentiation, cleavage, progression of cell cycle and apoptosis (Seger and Krebs, 1995). Thus, abnormalities in the MAPK signaling pathway can lead to very different results from apoptosis to cancer formation (Simon et al., 1999). However, little is known about the role of this signaling pathway in neuroblastoma cancer. There are only a few studies suggesting that this signaling pathway has a role in neuroblastoma cells transforming into the transformed phenotype and acquiring drug-resistance (Mattingly et al., 2001). Under normal cell conditions, it has been understood that these two signaling pathways act in communication and interaction with each other. At this point, while trying to figure out the factors involved in the intersection of these two signal paths, some points that can shed light on this intersection are striking. Not only direct interaction between the members of these two pathways, but also mediator-dependent interactions, independent from both pathways' members, should be considered, since there are studies giving insights about certain cell cycle regulators which may be involved in the intersection of these signaling pathways. It has been shown that over-activity or over-expression of some cell cycle regulators such as Speedy/RINGO, a novel cell cycle regulator, cause cells to become cancerous and become aggressive by escaping them from apoptosis. Yet, it has been shown that just as AKT over-expression, over-expression of Speedy/RINGO results in chemotherapy resistance (Lubanska et al., 2014). If this is the case, it is crucial to figure out a potential interaction between the Speedy/RINGO and AKT pathway. Besides, a few studies about the development of breast tissue and tumorigenesis showed that MAPK pathway over-activation results in Speedy/RINGO over-expression and if MEK1 enzyme, a member of the MAPK pathway is inhibited, Speedy/ RINGO expression is shown to be decreased. On the other hand, studies on testis tissue showed that overexpression of Speedy/RINGO protein causes an increase in cell cycle regulators Cyclin A2-CDK2 expression. Mouse embryonic stem cell studies revealed that the Cyclin A2-CDK2 complex has an important role in AKT hyper-phosphorylation which is one of the most effective factors causing chemotherapy resistance in many cancer types (Liu et al., 2014). In all of the above-mentioned studies, the connection of Speedy/RINGO and other potent cell cycle regulators with AKT and MAPK pathways are studied partially rather than analyzing them all together for possible interaction. Besides, all the studies are performed in cancers other than neuroblastoma. In all of the above-mentioned studies, connection of Speedy/RINGO with AKT and MAPK pathways is studied partially and also these studies are performed with cell and tissue types other than neuroblastoma. Thus, to date, there is not any data available showing the connective role of Speedy/RINGO in between AKT and MAPK pathways in any cancer type. In this direction, the first aim of this study is to inhibit the MAPK pathway with specific chemical agents to see if there would be a corresponding decrease in the expression of Speedy/RINGO. Then, CDK2 expression and AKT phosphorylation levels would be analyzed, accordingly. In addition, the effect of this inhibition study on the vitality of the cells would be analyzed by a cell viability test. All data that would be obtained at the end of this study will give us crucial information for the first time about the connecting and hence over-activating function of Speedy/RINGO in between AKT and MAPK pathways. This study might allow us to understand the interactions between different intracellular mechanisms and to choose the appropriate molecular targets for both diagnosis and treatment of many cancer types.

## MATERIALS AND METHODS

SH-SY5Y neuroblastoma cells were cultured at 37°C with 5% $CO_2$ at 1 atmospheric pressure in high-glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-Glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). When the cells reached sufficient confluence, they were washed with sterile phosphate buffered saline (PBS). Then, the cells were removed from the petri dish with a 10X stock solution of 2.5% sterile trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (Trypsin-EDTA). Firstly, $10^6$ SH-SY5Y cells were cultured at 37°C with 5% CO2 for ~24 hours to adsorption. Then, 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) was applied to the cultured control cells and 10 mM U0126 (Chemcruz) was applied to the cultured cells. Treated cells were incubated at 37°C with %5 CO2 for 24 and 48 hours. Secondly, SH-SY5Y cells were grown on 6 well-plates as $10^5$ cells/well and they were incubated at 37°C with %5 CO2 for ~18-20 hours in order to obtain 60-80% confluency. Control siRNA and Speedy A siRNA (Santa Cruz Biotechnology) mix were applied to cultured cells. Treated cells were incubated at 37°C with %5 CO2 for ~48 hours. To analyze the effect of inhibition ERK/MAPK signaling cascade and downstream effects of

this inhibition on Speedy/RINGO expression and PI3K/AKT phosphorylation levels were evaluated by Western blotting. Besides, Speedy/RINGO silencing effect on ERK/MAPK and PI3K/AKT signaling cascades were analyzed. Results were evaluated by Western blotting using appropriate antibodies. For all experimental conditions, cell survival rates were measured by the MTS cell viability test.

## RESULTS

In our study, we used the SH-SY5Y neuroblastoma cell line to investigate the function of Speedy/RINGO on the ERK/MAPK and PI3K/ AKT pathways. Our results showed that inhibition of ERK/MAPK signaling cascade causes a decreasing effect on Speedy/RINGO expression and PI3K/AKT phosphorylation levels (Figure 1).

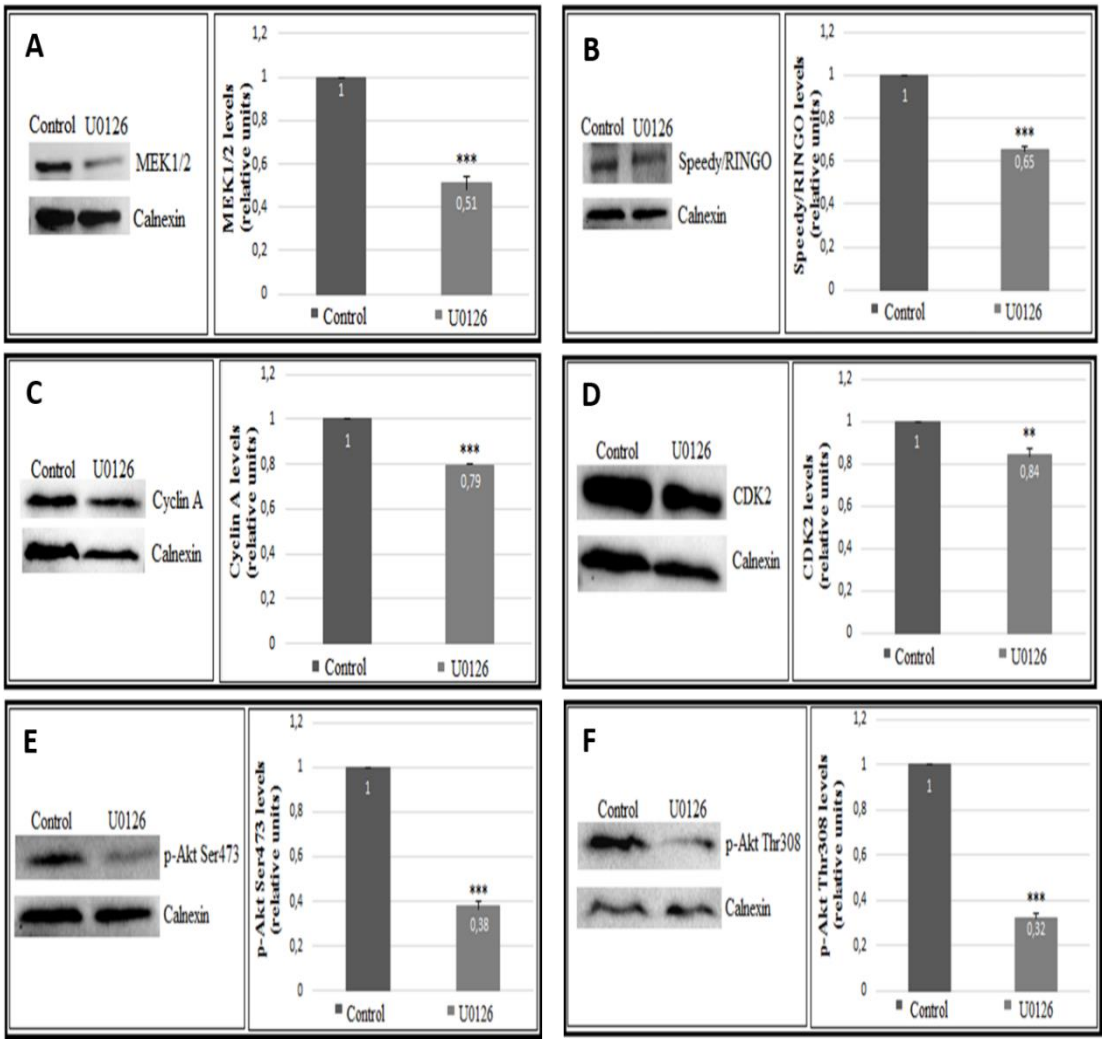



**Figure 1.** Results of western blotting for MEK 1/2 (A), Speedy/RINGO (B), Cyclin A (C), Cdk2 (D), Phospho-AKT_Ser 473 (E) and Phospho-AKT_Thr308 (F) protein levels after U0126 treatment (17/023 BAP AR-GE, unpublished data).

Moreover, downregulating the Speedy/RINGO gene significantly alters expression levels and phosphorylation states of certain members of the ERK/MAPK and PI3K/AKT pathways (Figure 2). This, in turn, leads to the apoptotic death of neuroblastoma cells, likely due to the absence of Speedy/ RINGO's regulatory function on these two pathways.

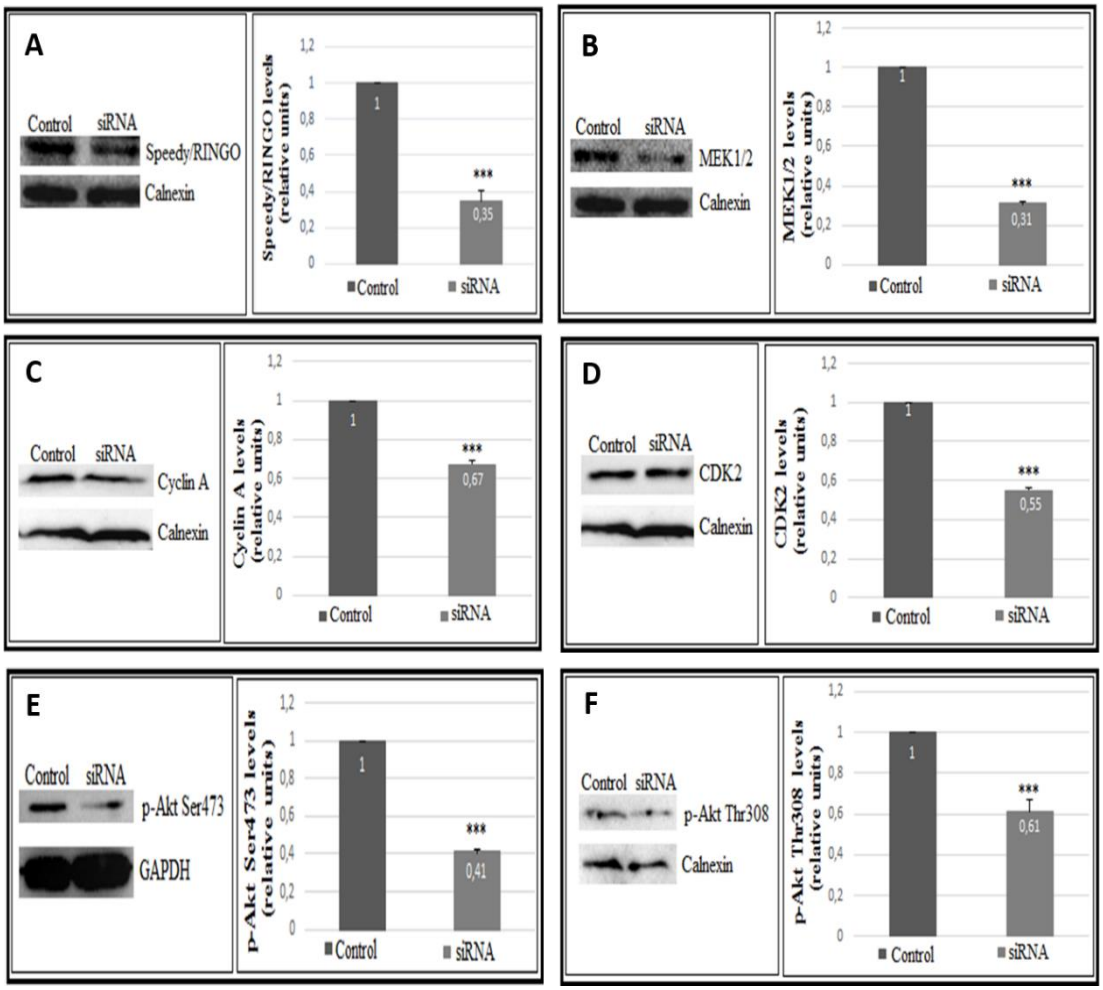



**Figure 2.** Results of western blotting for Speedy/RINGO (A), MEK 1/2 (B), Cyclin A (C), Cdk2 (D), Phospho-AKT_Ser 473 (E) and Phospho-AKT_Thr308 (F) protein levels after siRNA application (17/023 BAP AR-GE, unpublished data).

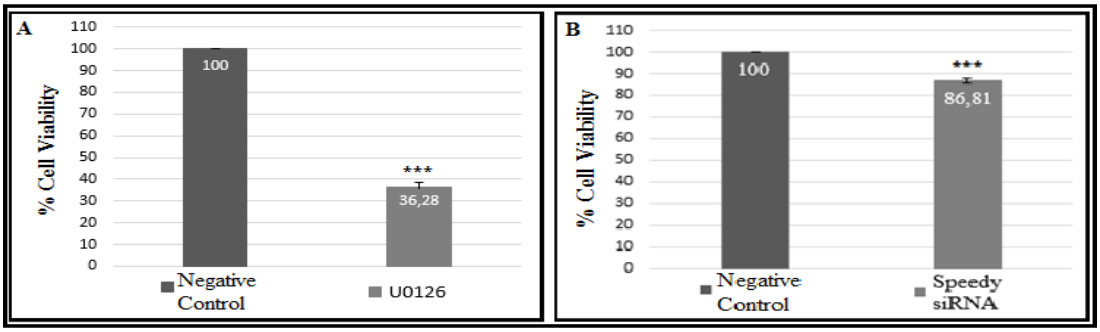



**Figure 3.** MTS cell viability assay results of U0126-treated SH-SY5Ycells (A) and Speedy/RINGO specific siRNA-treated SH-SY5Y cells (B)

## DISCUSSION

It is known that the growth and survival of many cancer cells with neuroblastoma related to the excessive signaling of MAPK (mitogenic) and AKT (survival) signaling pathways and the mutual interaction of these two signaling pathways. The heterogeneous characteristics of neuroblastoma and the over activation of these two signaling pathways lead to resistance to chemotherapy and a reduction in the treatment efficacy (Aksamitiene et al., 2012). All results confirm that Speedy / RINGO is the underlying cause of the interaction between MAPK and AKT signaling pathways. The results are revealed that MAPK and AKT pathways are over-activated by communicating with each other via Speedy / RINGO protein in the neuroblastoma cell line

for the first time. Furthermore, inhibition of the MAPK signaling pathway with U0126 and silencing of Speedy / RINGO protein by siRNA method resulted in a decrease in cell viability (Figure 3). Decreases in the oncogenic proteins Speedy / RINGO and phosphorous ACT levels cause this decrease in the viability of cancerous cells. The decrease in the expression levels of oncogenic proteins (Speedy/RINGO and phosphorylated AKT) seems to be significant both biologically and therapeutically which causes a decline in the viability of cancerous cells. The interaction of MAPK (mitogenic) and AKT (survival) signaling pathways, which are known to be overexpressed in many cancer types, is highly effective in the emergence of an oncogenic condition. The elucidation of the molecules in the focus of this interaction in SH-SY5Y neuroblastoma cells is important to understand the interactions between different intracellular mechanisms and to choose the appropriate molecular targets for both diagnosis and treatment of many cancer types.

## CONCLUSION

All the experimental data related to SH-SY5Y neuroblastoma cells showed that Speedy / RINGO is one of the strongest candidate protein between the AKT and MAPK signaling pathways. Moreover, Speedy / RINGO cause the overexpression of these two signaling pathway. MAPK-AKT-Speedy/RINGO triple interaction revealed in neuroblastoma cells for the first time. The results of our experiment demonstrated that Speedy / RINGO is the most probable candidate protein between the linkage of MAPK and AKT signaling pathways. Also, the effect of Speedy / RINGO protein on the AKT signaling pathway was demonstrated for the first time. All results provide important information to develop effective and accurate targets for the treatment of neuroblastoma known to be resistant to chemotherapy. All in all, molecular mechanisms reasons underlying the deregulation of MAPK and AKT signaling pathways, which play a key role in the formation of many cancers, especially neuroblastoma cancer, will become more comprehensible.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Scientific Research Project Office of Mugla Sitki Kocman University (Project Numbers: 17/251 and 17/023)

## REFERENCES

Aksamitiene, E., Kiyatkin, A. ve Kholodenko, B.N. (2012) Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance, *Biochem Soc Trans,* 40: 139-146.

Boller D, Schramm A, Doepfner KT, Shalaby T, von Bueren AO, Eggert A, et al 2008. Targeting the phosphoinositide 3-kinase isoform p110 delta impairs growth and survival in neuroblastoma cells. Clinical Cancer Research, 14(4):1172-1181.

Courtney KD, Corcoran RB and Engelman JA 2010. The PI3K pathway as drug target in human cancer. J Clin Oncol, 28 (6): 1075-1083.

De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N 2012. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signaling pathways: Role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. Expert Opin Ther Targets, 16: S17–S27.

Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, Sakurai M, Tsuchida Y, Takeda T, Okabe I and Sakurai M 1987. Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. Cancer Res, 47 (1): 311-318.

Kolch W 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J, 351 (Pt2): 289-305.

Li Z, Thiele CJ 2007. Targeting Akt to increase the sensitivity of neuroblastoma to chemotherapy: Lessons learned from the brain derived neurotrophic factor/TrkB signal transduction pathway. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 11(12):1611-1621.

Liu P, Begley M, Michowski W 2014. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. Nature, 508: 541-545.

Lubanska D, Porter LA 2014. The atypical cell cycle regulator Spy1 suppresses differentiation of the neuroblastoma stem cell population. Oncoscience, 1(5): 336-348.

Mattingly RR, Milstein ML and Mirkin BL 2001. Down-regulation of growth factor-stimulated MAP kinase signaling in cytotoxic drug-resistant human neuroblastoma cells. Cell Signal, 13 (7): 499-505.

Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin KM, Fulda S 2007. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. Cancer Research, 67(2):735-745.

Park JR, Eggert A, Caron H 2010. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. Hematol Oncol Clin North Am, 24:65–86.

Paz-Ares L, Blanco-Aparicio C, Garcia-Carbonero R, Carnero A 2009. Inhibiting PI3K as a therapeutic strategy against cancer. Clinical & Translational Oncology, 11(9):572-579.

Porta, C, Paglino C and Mosca A 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. Front Oncol, 4 (64): 1-11.

Schubbert S, Shannon K and Bollag G 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer, 7 (4): 295-308.

Seger R., Krebs EG 1995. The MAPK signaling cascade. The FASEB Journal, 9(9), 726–735.

Simon C, Hicks MJ, Nemechek AJ, et al 1999. An inhibitor of ERK1 activation, attenuates the in vivo invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. Br J Cancer, 80:1412-9.

Tanaka T, Slamon DJ, Shimoda H, Waki C, Kawaguchi Y, Tanaka Y and Ida N 1988. Expression of Ha-ras oncogene products in human neuroblastomas and the significant correlation with a patient's prognosis. Cancer Res, 48 (4): 1030-1034.

# Isolation and characterization of thermophilic bacteria from hot spring in Çermik, Diyarbakır

Fatma Matpan Bekler[1*], Kemal Güven[2], Seçil Yalaz[3], Reyhan Gül Güven[4],

[1*] Dicle University, Science Faculty, Biology Department, 21280 Diyarbakır,Turkey.

[2] Dicle University, Science Faculty, Molecular Biology and Genetics Department, 21280 Diyarbakır,Turkey.

[3] Dicle University, Science Faculty, Statistics Department, 21280 Diyarbakır,Turkey.

[4]Dicle University, Ziya Gökalp Education Faculty, Science Teaching Section, 21280 Diyarbakır,Turkey.

*Corresponding author: fmatpan@dicle.edu.tr

## Abstract

Hot water springs are one of the natural habitats, especially for thermophilic microorganisms, which also provide an important opportunity for thermostable biomolecules. This study aimed to isolate and characterize thermophilic bacteria from Çermik hot water spring in Diyarbakır. Twenty seven thermophilic bacterial strains were isolated and the colony and cell morphology, physio-biochemical tests, antibiotic susceptibility tests, MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry) and 16S rRNA gene sequencing of these strains were evaluated by comparing both phenotypic and phylogenetic characteristics. The optimum growth conditions (time, temperature, pH, salt tolerance, etc.) of the strains were determined. The potential of the isolated strains to produce enzymes of biotechnological importance was also investigated. Five of the isolated thermophilic bacteria, including *Brevibacillus agri*, *Bacillus zhangzhounesis*, *Deinococcus sahariens*, *Bacillus licheniformis* grew at 55 °C. It was determined that 13 bacteria out of 27 isolated bacteria showed some enzyme activity such as □□amylase, protease and lipase etc. which have biotechnological potential. The present study comprehensively demonstrates the diversity of bacteria in the Çermik hot water springs and thus contributes to data base on thermophilic bacteria.

**Key words:** Hot water springs, Thermophilic, *Bacillus*, 16S rRNA

## INTRODUCTION

Based on the temperature range necessary for the efficient growth condition, thermophiles have been classified. While moderate thermophiles grow within the range of 50–60 °C, extreme thermophiles and hyperthermophiles thrive at 60–80 °C and at 80–110 °C respectively (Gupta et al., 2014). The study of thermophile community organization and the exploration of thermostable biomolecules and biocatalysts for industrial and biotechnological purposes have thus become possible thanks to hot spring ecosystems (Yasir et al 2019).

Turkey, with high numbers of geothermal sources, houses 140 geothermal sites recorded officially (Ercan Akkaya and Kıvanç, 2008). However, the number of the studies pertaining to the microbial characteristics and biotechnologically important thermophilic microorganism profiles of these sources has been rare despite the existence of lots of thermal sources in our country (Guven et al., 2018). Çermik hot spring in the province of Diyarbakır is regarded as one of the significant thermal tourism centres along with the others in Turkey and it is situated in a zone that is tectonically effective, active seismic, and rich in terms of geothermal resources (Başkaya 2015).

Molecular methods are very valuable tools to investigate the structure and diversity of bacterial communities (Doğruöz Güngör, 2015). 16S rRNA gene is more preferable for phylogenetic identification than the other two rRNA genes because it contains conserved regions where optimal combinations can be created for PCR primers and also contains variable regions that act as an evolutionary stopwatch (Gürsoy and Otlu 2017).

In this study, molecular technics have been employed for characterizing thermophilic bacteria from hot springs. Samples were provided from Çermik hot springs in Diyarbakır, Turkey. Using phenetic characterization, MALDI-TOF-MS and 16S rRNA gene sequencing, 13 species were identified from among 27 purified isolates.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling and isolation of bacteria

In order to isolate thermophilic bacteria, water and mud samples were taken from the hot water spring located in Çermik district of Diyarbakır province (38° 8 '27.2544' 'N, 39°28' 46.6068 " E). The pH and the temperature of the sample was measured and the all samples were stored in aseptic environment in sterile bottles of 50 mL and transported to the laboratory.

The mud and water samples were added to saline water and were serially diluted ($10^{-1}$ to $10^{-4}$), and then were spread on the modified liquid Thermus medium (TM) [Tryptone, 3 g/L; Yeast extract, 1 g/L; containing Nitsch's trace element (0.5 ml/L) and Castenholz salts (100 ml/L)] and incubated at 50 °C for 24 hours in a shaker. After cultivation, samples were streaked on Thermus medium agar (TMA) and incubated at 50 °C for 2 days. Subsequently, different colonies developed in the media were selected and purified by sub-culturing. When growth was recorded, the identification was done by MALDI-TOF MS. Isolated strains were preserved in Cryotubes containing 15% glycerol at -80 °C at Dicle University Faculty of Science Molecular Biology Research Laboratory.

### Genomic DNA extraction and PCR amplification

The isolates were grown aerobically at 55 °C for 2 days in TM medium. After cultivation cells were harvested by centrifugation (10.000 rpm for 10 min), and the genomic DNA was extracted using DNA extraction kit (EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA, Poland) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification of the 16S rRNA gene was performed from the extracted DNA (10-20 ng) of each isolate as previously described using universal primers (27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' and 1492R 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') 200 nM of each, FIREPol® DNA Polymerase, PCR buffer (New England Biolabs), dNTPs (0.2 mM of each) and MgCl2 (1.5 mM). The PCR amplification consisted of initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s, annealing at 57 °C for 45 s, extension at 72 °C for 60 s, and a final polymerization step of 72 °C for 5 min. PCR products were then checked on 1.5% agarose gel. The PCR products were purified (HighPrep™ PCR Clean-up System) and then sequenced by BM Labosis (https://www.bmlabosis.com/).

### Phylogenetic analysis

After sequencing, multiple alignments were performed using the CLUSTAL X program and all sequences were compared using a BLAST search tool database on NCBI [National Centre of Biotechnology (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)] and EzTaxon (https://www.ezbiocloud.net). Evolutionary distance matrices were generated and phylogenetic trees were performed by the neighbour-joining method. Neighbour-Joining algorithm incorporated in MEGA 7. The topologies were evaluated by bootstrap sampling expressed as percentage of 1000 replicates.

### Phenotypic characterization of the bacterial strains

The selected colonies were characterized by phenotypic cell morphology based on shape, size, colour, surface, height, cell wall, light and density. Cell morphology and motility were examined using light microscope. Gram staining was performed according to Dussault (1955) using light microscopy. The formation of spores was tested by microscopic observations with malachite green staining. Different biochemical properties of selected isolates were determined by some tests such as oxidase activity, catalase activity, starch hydrolysis, gelatine hydrolysis, urease activity, as well as tests such as motility, citrate, indole and tyrosine usage. All physiological, biochemical tests were repeated in triplicate. To determine the effect of temperature on growth, bacteria were inoculated into sterile NB broth (pH 7.0) and incubated at different temperatures (20-80 °C) for 24 hours. Then the optimum temperature for growth was determined by measuring at 600 nm by spectrophotometer. In order to determine the effect of pH on growth, NB broth was prepared using citric acid (for pH 4.0-6.0), Tris-HCl (for pH 6.0-9.0) and glycine-NaOH (for pH 10.0–11.0). Bacteria were inoculated separately and incubated for 24 hours at determined optimum temperatures. Optimum pH was determined by measuring at 600 nm using spectrophotometer.

**Phenogram analysis**

Numerical identification of the strains was performed with MATLAB computer program. The program uses UPGMA method to produce numerical taxonomy and phenogram and compares the test results of an unknown isolate with the known test result scales in these tests for a collection of related bacterial species, using established numerical methods. Nearly all of the characters existed in one or two mutually exclusive states and scored positive (+) or negative (-). Some characters could not be determined and scored as ND (not determined). Qualitative multistate characters were coded as several independent characters and were scored present (1) for the character state, absent (0) and ND (0.5) for other alternatives.

**Antibiotic susceptibility test**

Antibiotic susceptibility testing was performed according to Murray et al. (1995). The isolated bacteria were cultured in NB broth. Bacteria prepared overnight were collected using 5 ml sterile 0.9% saline solution, and absorbance was adjusted to 0.5 McFarland turbidity standard (5 x 105 CFU / mL) using spectrophotometer. Bacteria were separately spread on NBA medium and allowed to dry for 3-5 min. Fucidic acid (10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Kanamycin (5 µg), Novobiocin (5 µg), Penicillin (2, 10 units), Nystatin (100 units), Gentamicin (10 µg), Streptomycin (10 µg) , Tilmicosin (15 µg), Bacitracin (10 units), Ampicillin (10 µg), Lincomycin (15 µg), Tetracycline (30 µg), Neomycin (10 µg) antibiotic discs were placed on culture-spread NBA medium and were incubated for 2 days. At the end of the incubation period, the inhibition zones around the antibiotic discs were measured and their antibiotic susceptibilities were evaluated.

**RESULTS**

In this study, the isolation and identification of thermophilic bacteria from Çermik hot spring, which is 90 km away from Diyarbakır, has been carried out. The obtained 27 isolates were given codes and 13 species were subjected to nearly complete 16S rRNA gene sequencing (Figure 1).

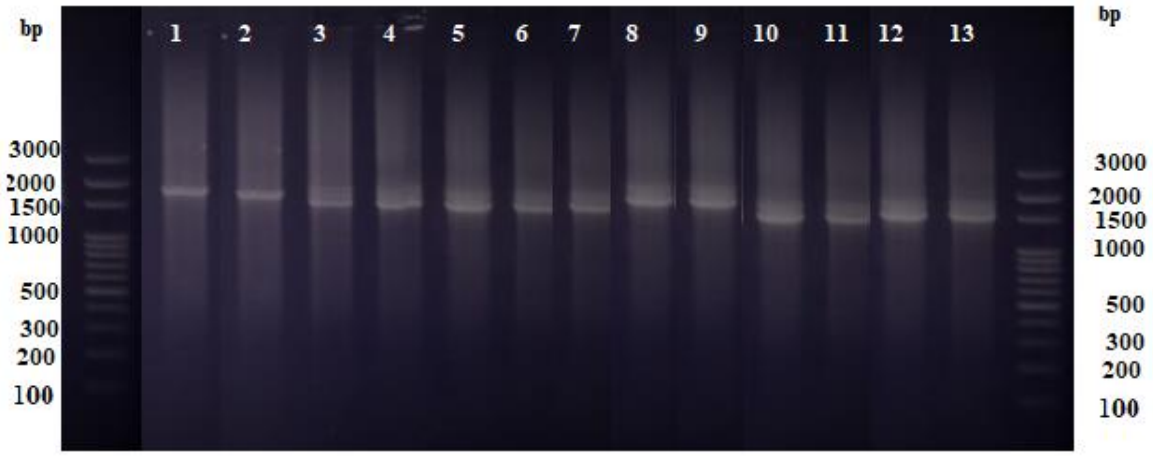



**Figure 1.** 16S rRNA gene PCR products of strains (1:3ÇA2, 2:2ÇM1, 3:2ÇA, 4:2NK, 5:2ÇM5, 6:2ÇM4, 7:3ÇA, 8:3NK1, 9:1SNK, 10:2ÇS, 11:3ÇA1, 12: 2Çx, 13:4Çx and 1.5% agarose gel, Solis Biodyne 100 bp DNA ladder)

All sequences were compared using a BLAST search tool database on NCBI and EzTaxon. The result of the 16S rRNA sequencing analysis, base pairs long and nucleotides similarity with related bacterial strains are presented in Table 1.

**Table 1.** Thermophilic bacteria isolated from Çermik hot spring and 16S rRNA gene sequences

| Number | Isolate | Related bacteria strains | Base pairs long | Nucleotides similarity (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 3ÇA2 | *Bacillus licheniformis* | 1113 | 99.82 |
| 2 | 2ÇM1 | *Brevibacillus brevis* | 1461 | 100 |
| 3 | 2ÇA | *Bacillus zhangzhounesis* | 889 | 99.44 |
| 4 | 2NK | *Brevibacillus schisleri* | 898 | 96.87 |
| 5 | 2ÇM5 | *Brevibacillus agri* | 874 | 99.08 |
| 6 | 2ÇM4 | *Bacillus zhangzhounesis* | 880 | 99.54 |
| 7 | 3ÇA | *Bacillus licheniformis* | 906 | 82.94 |
| 8 | 3NK1 | *Paenibacillus lactis* | 1335 | 99.93 |
| 9 | 1SNK | *Deinococcus sahariens* | 860 | 88.84 |
| 10 | 2ÇS | *Bacillus licheniformis* | 1409 | 99.79 |
| 11 | 3ÇA1 | *Paenibacillus macerans* | 840 | 99.52 |
| 12 | 2Çx | *Geobacillus vulcani* | 1532 | 99.98 |
| 13 | 4Çx | *Anoxybacillus rupiensis* | 1518 | 99.99 |

The strains are sorted into two main groups: 12 strains belonged to Firmicutes (92.3%) and 1 strain belong to Deinococcus-Thermus (7.69%). The Firmicutes are grouped into two families; *Bacillaceae* and *Paenibacillaceae*, where there are 7 (53.84%) strains affiliated within the family *Bacillaceae* with three different genera including *Bacillus*, *Anoxybacillus* and *Geobacillus*. Furthermore, there are 5 (38.46%) strains affiliated within the family *Paenibacillaceae* was represented by two genus, *Paenibacillus* and *Brevibacillus*. There was only one strain belonged to *Deinococcaceae* within the genus *Deinococcus* (Figure 2).

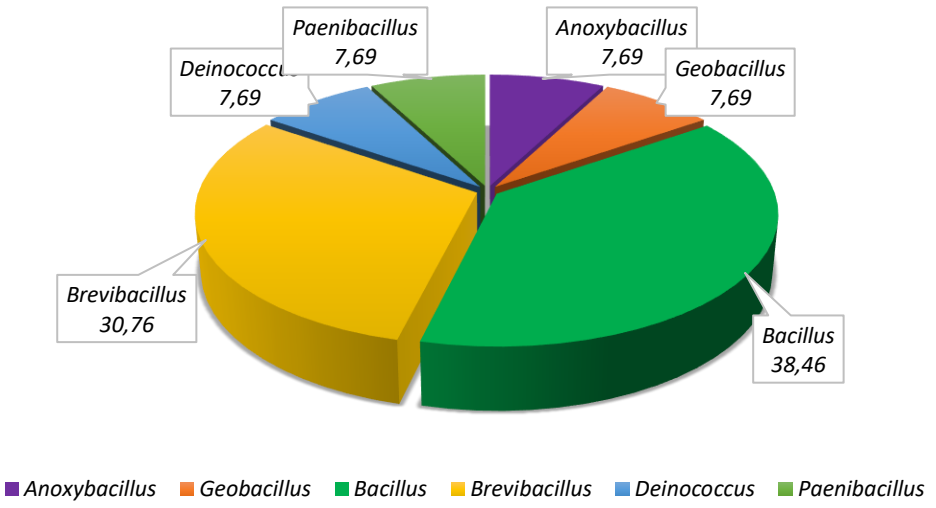



**Figure 2.** Percentage of dominant bacterial species in Çermik hot spring

When the phylogenetic similarity of the isolated strains is examined, Firmicutes appears to be a more dominant group with 12 strains and only one strain belongs to Deinococcus as seen in Figure 3.

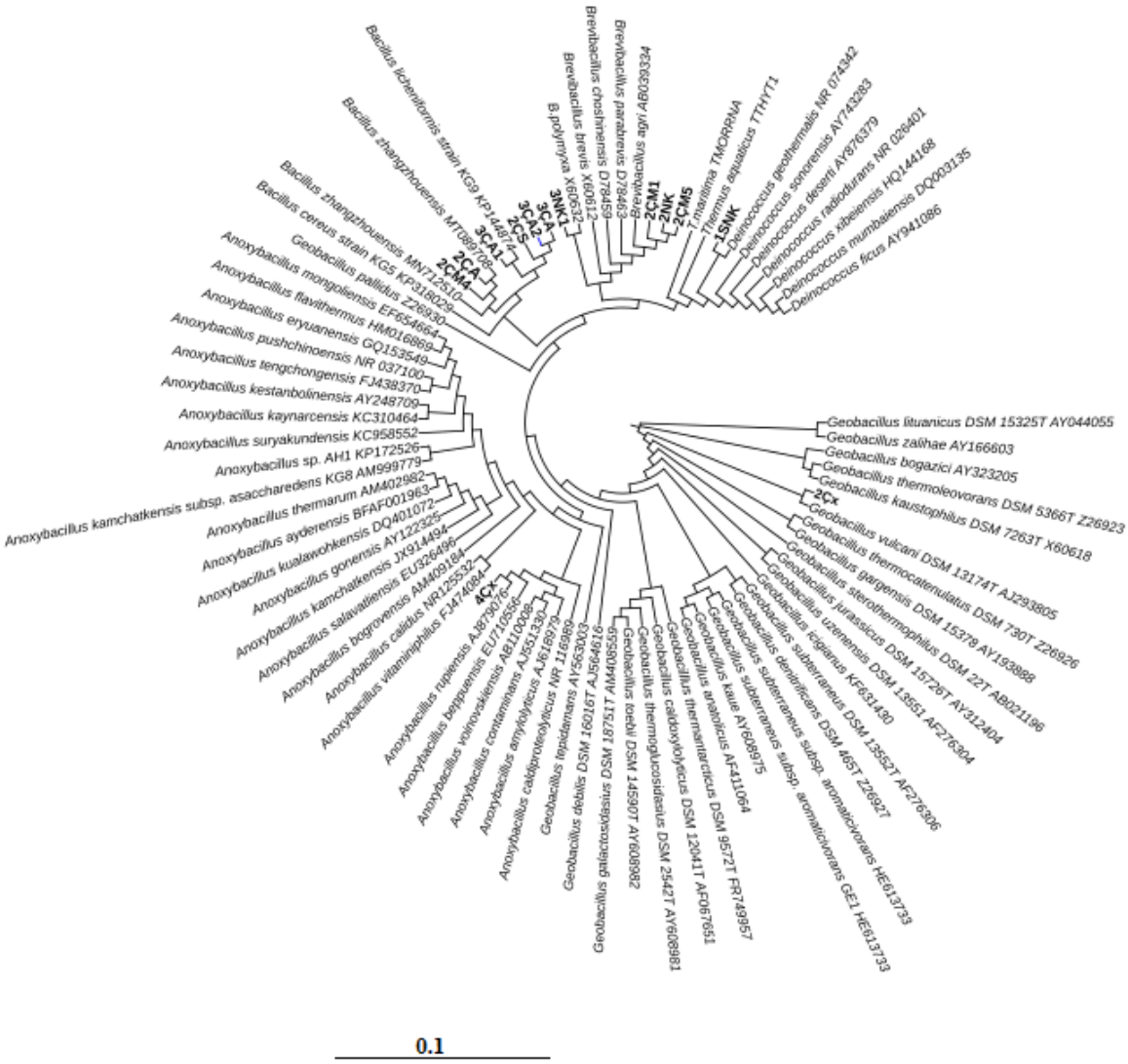



**Figure 3.** Phylogenetic analysis showing the position of the isolated strains relative to the other strains based on 16S rRNA gene sequences. Phylogenetic tree was constructed using Neighbour-joining method by Mega 7. (Bootstrap values:1000)

**Phenotypic characterization of the isolated strains**

Morphological and physio-biochemical analyses of selected strains were performed. In addition, High-throughput MALDI-TOF-MS was used to identify the isolates. It is a new technique that is fast, inexpensive, and has recently been used to identify microorganisms (Croxatto et al. 2012). Threshold score of 1.9 was used for correct identification of the bacterial species (Angelakis et al., 2014). According to result of MALDI-TOF-MS, isolates with a score <1.9 were processed for 16S rRNA gene sequencing.

Colony morphology was evaluated with its characteristics such as shape (dot, circular, uniform or irregular shape), edge shape (regular, notched or rhizoid shape), size, surface (bright, rough, wrinkled, dry powdery), colony height (flat, raised, convex, domed or buttoned), colour, and the thickener (solid or sticky). Morphological and biochemical characteristics of these strains are shown in Table 2.

**Table 2.** Morphological and biochemical characteristics of isolated strains

| Characteristic | 3ÇA2 | 2ÇM1 | 2ÇA | 2NK | 2ÇM5 | 2ÇM4 | 3ÇA | 3NK1 | 1SNK | 2ÇS | 3ÇA1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Shape of cells** | Rod | Rod | Rod | Rod | Rod | Rod | Rod | Rod | Coc | Rod | Rod |
| **Gram staining** | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| **Motilitiy** | (+) | (+) | (-) | ND | (+) | (+) | ND | (+) | (-) | (+) | (+) |
| **Spore formation** | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| **Catalaz activity** | (+) | (+) | (+) | (-) | (+) | (+) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| **Oxidase** | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) | (+) |
| **Urease** | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| **Citritase** | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| **Indol production** | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| **Tirozin** | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) |
| **Hydrolysis of gelatin** | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) | (+) | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| **Hydrolysis of Cazeine** | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) | (+) | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) |
| **Hydrolysis of Starch** | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | (+) | (+) |
| **Temperature (°C)** | 35-60 | 35-60 | 35-60 | 35-60 | 35-60 | 35-60 | 35-65 | 35-65 | 35-50 | 35-65 | 35-65 |
| **Optimum temperature (°C)** | 45 | 50 | 50 | 45 | 50 | 50 | 50 | 55 | 45 | 55 | 55 |
| **pH** | 6.0-9.0 | 5.0-10.0 | 5.0-10.0 | 5.0-10.0 | 5.0-9.0 | 5.0-10.0 | 5.0-10.0 | 5.0-9.0 | 5.0-9.0 | 6.0-10.0 | 6.0-10.0 |
| **Optimum pH** | 7.0 | 6.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 6.0 | 7.0 | 8.0 | 7.0 | 7.0 | 8.0 |

Strains 3Ç2, 2ÇM1, 2Ç, 2NK, 2ÇM5, and 2ÇM4 grow between 35-60 °C, while 3ÇA, 3NK1, 2ÇS and 3ÇA1 show reproduction between 35-65 °C. The optimum temperature for 3ÇA2, 2NK and 1SNK1 is 45 °C, the optimum temperature for 2ÇM1, 2ÇA, 2ÇM5, 2ÇM4 and 3ÇA is 50 °C, and the optimum temperature for 3NK1, 2ÇS and 3ÇA1 is 55 °C (Table 2).

Phenogram tree, which is formed by phenetics, is obtained by MATLAB computer program using UPGMA method (Figure 4). In UPGMA method, all the nodes thought have equal distance from the root. This means that UPGMA is "ultrametric". The process uses the nearest two clusters to combine them into a higher-level cluster. In this phenetic analysis, a maximum number of nodes can be given to generate a phenogram or a phenogram containing all possible nodes can be generated without giving the number of nodes. In the present study, all possible nodes were obtained without giving the number of nodes (Figure 4).

In phenetic classification of isolated strains, 21 *Anoxybacillus*, 20 *Geobacillus* strains, 12 *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Deinococcus* strains and 13 characters were used. Phenetic classification was carried out following the published studies of thermophilic *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Deinococcus* species recorded in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) as new species.

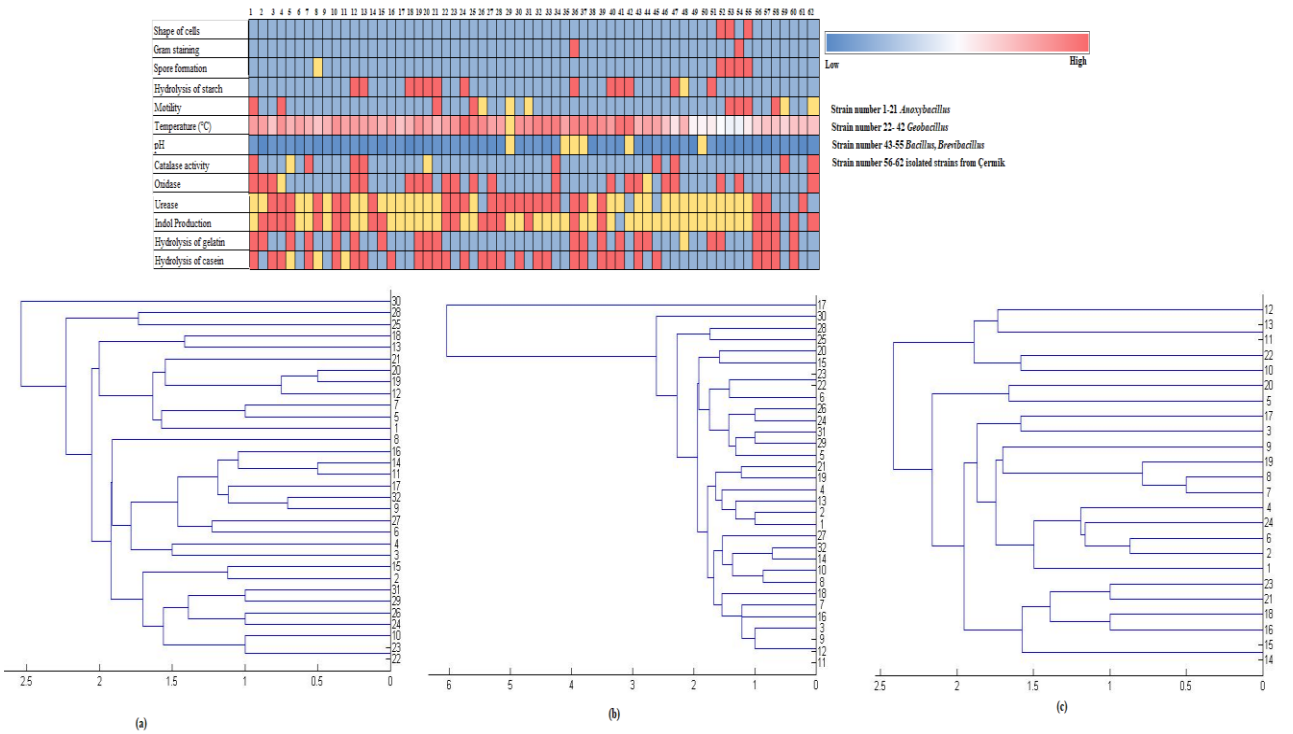



**Figure 4.** Phenogram tree showing the similarity and relationship of the phenetic characters of the strains and other related species. (a) phenogram of strains and other *Anoxybacillus* strains, (b) phenogram of strains and other *Geobacillus* strains, (c) phenogram of strains and other *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Deinococcus* strains.

Antibiotic susceptibility testing was performed using 14 different antibiotics. At the end of the incubation period, the inhibition zones around the antibiotic discs were measured and their antibiotic susceptibilities were evaluated. Effects of some antibiotics on isolated strains were determined by measuring the inhibition zones (mm) and heat map of antibiotics resistance detected and isolated strains are shown in Table 3. Cells in blue signify resistance and cells in red signify sensitivity for the isolated strains. According to these results, it is seen that all strains are resistant to Nystatin antibiotic and sensitive to Kanamycin, Gentamicin, Tetracycline and Neomycin antibiotics.

**Table 3.** The heat map of some antibiotics on isolated strains

| Antibiotics | 3ÇA2 | 2ÇM1 | 2ÇA | 2NK | 2ÇM5 | 2ÇM4 | 3ÇA | 3NK1 | 1SNK | 2ÇS | 3ÇA1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Fucidic acid(10 µg)** | 13 | 23 | 28 | 18 | 0 | 0 | 10 | 13 | 0 | 13 | 0 |
| **Chloramphenicol(30 µg)** | 14 | 17 | 0 | 13 | 0 | 0 | 11 | 18 | 23 | 0 | 20 |
| **Kanamycin(5 µg)** | 25 | 20 | 17 | 14 | 11 | 15 | 14 | 17 | 27 | 13 | 15 |
| **Novobiocin (5 µg)** | 14 | 13 | 0 | 18 | 0 | 0 | 17 | 11 | 18 | 0 | 0 |
| **Penicillin(10 units)** | 15 | 30 | 0 | 25 | 0 | 0 | 26 | 22 | 30 | 25 | 17 |
| **Nystatin(100 units)** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Gentamicin(10 µg)** | 29 | 25 | 19 | 19 | 13 | 23 | 12 | 16 | 30 | 25 | 12 |
| **Streptomycin(10 µg)** | 13 | 18 | 20 | 15 | 11 | 4 | 16 | 11 | 19 | 18 | 14 |
| **Tilmicosin (15 µg)** | 20 | 25 | 0 | 20 | 18 | 14 | 18 | 21 | 20 | 21 | 20 |
| **Bacitracin(10 units)** | 13 | 12 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 17 | 13 | 10 | 0 |
| **Ampicillin (10 µg)** | 0 | 26 | 15 | 15 | 0 | 0 | 17 | 13 | 29 | 24 | 19 |
| **Lincomycin (15 µg)** | 30 | 0 | 0 | 30 | 22 | 15 | 21 | 23 | 15 | 0 | 0 |
| **Tetracycline(30 µg)** | 18 | 27 | 28 | 18 | 14 | 29 | 16 | 12 | 30 | 25 | 12 |
| **Neomycin (10 µg)** | 23 | 15 | 30 | 20 | 21 | 23 | 13 | 15 | 18 | 13 | 12 |

Resistance — Sensitivity

## CONCLUSION

Turkey is a rich geothermal area and the 7th on the list of the world geothermal energy potential. More than 600 geothermal springs exist especially in Aegean Region, Northwest, Middle Anatolia, and East and Southeast Anatolia regions formed by active faults and volcanism. Hot springs from geothermal areas are natural habitats for thermophilic microorganisms. With this study, microbial diversity has been determined with molecular and phenetic analysis for the first time in Çermik hot spring. These methods revealed the existence of different genera *Bacillus* (including *B. licheniformis* and *B. zhangzhounesis*), *Brevibacillus* (including *B. brevis, B. schisleri* and *B. agri*), *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* (including *P. lactis* and *P. macerans*), and *Deinococcus* and these thermophilic bacteria were commonly found in Çermik hot spring.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Dicle University Scientific Research Projects (DUBAP, project FEN.17.028). We would like to acknowledge Dicle University Scientific Research Projects.

### Authors' contributions

Designing the experiments: FMB and KG, isolation and characterization of the isolate: FMB and RGG, bioinformatics analysis: FMB and SY, Analysing the data: FMB, KG, and SY. Writing of the paper: FMB, KG, SY, and RGG. All authors read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

Angelakis E, Yasir M, Azhar EI, et al. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry and identification of new bacteria species in air samples from Makkah, Saudi Arabia. BMC Res Notes 7, 892.

Başkaya Z. 2015. Assessing Çermik (Diyarbakir) hot springs in relation with geographical factors and potential of thermal tourism. Turkish Studies International Periodical for the Languages, Literature and History of Turkish or Turkic Volume 10/6 Spring: 307-340.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. 2011. Applications of MALDI-TOF MS mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS microbiology reviews. 36. 380-407.

Doğruöz Güngör N. 2015. Some molecular techniques applied in determination of environmental microbial diversity. Journal of Engineering and Natural Sciences, Sigma, 33:54-64.

Dussault, HP. 1955. An improve technique for staining for halophilic bacteria. Journal of Bacteriology 70. 484-485.

Ercan Akkaya S, Kıvanç M. 2008. Isolation and Identification Methods of Gr(+) Bacils Living In Hot Springs. Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering. 2. 61-70.

Gupta GN, Srivastava S, Khare SK, and Prakash V. 2014. Extremophiles: An overview of microorganism from extreme environment. Int J Agric Environ Biotechnol 7, 371

Gürsoy NC, Otlu B. 2017. Molecular Diagnostic Tests in Microbiota Investigations. J Biotechnol and Strategic Health Res. 1 (Special issue): 56-67.

Guven K, Matpan Bekler F, Gul Guven R. 2018. Thermophilic and Halophilic Microorganisms Isolated from Extreme Environments of Turkey, with Potential Biotechnological Applications. In: Egamberdieva D, Birkeland NK, Panosyan H, Li WJ. (eds) Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications. Microorganisms for Sustainability, vol 8. Springer, Singapore.

Murray PR., Baron EJ, Pfalle MA, Tenover FC, Yolke RH. 1995. Manual of clinical microbiology. 6th edition, ASM Press, Washington, DC.

Yasir M, Qureshi AK, Khan I, Bibi F, Rehan M, Khan SB, Azhar EI. 2019. Culturomics-Based Taxonomic Diversity of Bacterial Communities in the Hot Springs of Saudi Arabia. OMICS A Journal of Integrative Biology. 23(1):17-27.

# Hidroponik (Su Kültürü) seralarda rüzgar-güneş hibrit sistemlerle iklimlendirmenin sağlanabilirliği: Tekirdağ ili örneği

Murat Özocak[1*]

*[1]Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Fakültesi, Biyosistem Mühendisliği Ana Bilim Dalı Doktora Öğrencisi, Tekirdağ, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: murat.ozocak@outlook.com

## Özet

Su kaynakları ve tarım alanlarında her geçen gün azalma meydana gelmektedir. Yenilenemeyen enerji kaynaklarının tükenme noktasına gelmesi ise yenilenebilir enerji kaynaklarına olan talebi arttırmıştır. Bu durumların yanı sıra, küresel ölçekte nüfus artışı da devam etmektedir. Son yıllarda bitkisel ürünler toprak olmadan su içerisinde yetiştirilmekte, büyüme için gerekli bitki besinleri ise yine su içerisindeki sıvı karışımdan sağlanmaktadır. Su kültürü sistemleri genellikle iklimlendirme kontrollü modern sera koşullarında kullanılmaktadır. Sera iklimlendirmesinde ise yenilenebilir enerji kaynaklarından faydalanılmakta olup, bu sayede enerji tasarrufu sağlanarak sürdürülebilir tarımsal üretim gerçekleştirilmektedir. Güneş, rüzgar, biyokütle gibi yenilenebilir enerji kaynaklarından ayrı ayrı yararlanma imkanı olmakla birlikte, günümüzde rüzgar ve güneş enerjisini birlikte değerlendiren hibrit sistemler ile modern sera iklimlendirilmesinin sağlanması da mümkündür. Bu çalışmada Tekirdağ bölgesinde su kültürü ile oluşturulabilecek hidroponik seralarda, rüzgar-güneş hibrit sistemli iklimlendirme sağlanarak sürdürülebilir tarımsal üretimin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle su kültürü sisteminden bahsedilmiş olup, daha sonrasında Tekirdağ ilinin tüm ilçelerinin güneş ve rüzgar enerji potansiyelleri araştırılarak, hidroponik sistemli seraların enerji ihtiyacını karşılama oranı belirlenmiştir. Tekirdağ ilinin tüm ilçelerinin yıllık güneşlenme süreleri, global radyasyon değerleri ve toplam güneş radyasyonu analiz edilmiştir. Rüzgar enerjisi potansiyeli, rüzgar hızı ve kapasite faktörü dağılımı ışığında, hangi bölgelerde rüzgar-güneş hibrit tip enerji kaynağı ile iklimlendirilecek hidroponik (su kültürü) seraların oluşturulabileceği belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan analiz sonucunda rüzgar-güneş hibrit sistem için toplam enerji potansiyelinin Şarköy, Malkara, Çerkezköy ve Çorlu ilçelerinde diğer bölgelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak diğer ilçelerde de belirli kapasitelerde rüzgar- güneş hibrit enerji kaynakları kullanılarak hidroponik seraların oluşturulmasının mümkün olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Hidroponik (Su kültürü) sistem, Sera, Seralarda İklimlendirme, Rüzgar- güneş hibrit enerji

# Availability of air-conditioning in hydroponic (Water Culture) greenhouses with wind-solar hybrid systems: Example of Tekirdağ province

## Abstract

There is a decrease in water resources and agriculture areas day by day. The fact that non-renewable energy sources reach the exhaustion point has increased the demand for renewable energy sources. In addition to these situations, global population growth continues. For this reason, the hydroponic system, which means cultivation in direct water in agriculture, has become widespread in recent years. In this system, plant products are grown in water without soil, and plant nutrients required for growth are provided from the liquid mixture in water. Water culture systems are generally used in climate-controlled modern greenhouse conditions. In greenhouse air conditioning, renewable energy sources are used, and sustainable agricultural production is realized by saving energy. Although it is possible to benefit from renewable energy sources such as solar, wind and biomass, it is possible to provide modern greenhouse air conditioning with hybrid systems that evaluate wind and solar energy together. In this study, it is aimed to realize sustainable agricultural production by providing wind-solar hybrid system air conditioning in hydroponic greenhouses that can be created with water culture in Tekirdağ region. For this purpose, the water culture system has been mentioned firstly, and then the

solar and wind energy potentials of all districts of Tekirdağ province have been investigated and the rate of meeting the energy needs of the hydroponic system greenhouses has been determined. Annual sunshine duration, global radiation values and total solar radiation of all districts of Tekirdağ province were analyzed. In the light of wind energy potential, wind speed and capacity factor distribution, it has been tried to determine in which regions hydroponic (water culture) greenhouses can be created to be air conditioned with wind-solar hybrid type energy source. As a result of the analysis, it has been observed that the total energy potential for wind-solar hybrid system is higher in Şarköy, Malkara, Çerkezköy and Çorlu districts compared to other regions. However, in other districts, it can be said that it is possible to create hydroponic greenhouses by using wind-solar hybrid energy sources in certain capacities.

**Keywords:** Hydroponic (Water culture) system, Greenhouse, Air conditioning in greenhouses, Wind-solar hybrid energy

## GİRİŞ

Günümüz koşullarında modern tarımsal üretim su kültürü (hidroponik sistem) ve ortam kültürü (substrat kültürü) olmak üzere iki farklı sistem ile topraksız şekilde yapılmaktadır. Bu sistemlerde durgun veya akan besin maddeleri ile bitkisel üretimin gerçekleştirilmesi söz konusudur (Sevgican,1999). Su kültüründe bitkiler besin eriyiği içerisinde yetiştirilmektedir (Winsor ve Schwarz,1990). Hidroponik sistemlerde bitkiler için gerekli olan su ve besin maddeleri tüm elementleri içeren besin eriyiklerinin içerisindedir (Jensen,1997).



Şekil. Su kültürü (hidroponik) modern serası

Günümüz koşullarında küresel anlamda hızla artan nüfus sonucunda enerji arayışları da hızla artmıştır. Enerji ile ilgili ihtiyacın artması, araştırmaları yenilenebilir kaynaklarda yoğunlaştırmıştır. Yenilenebilir kaynakların tek başına değerlendirilmesi mümkün olduğu gibi birden fazla enerji kaynağının birlikte değerlendirilmesi de mümkün olmaktadır. Hibrit kaynaklı enerji üretim sistemleri iki veya daha fazla farklı yapıda enerji üretim sistemlerinin bir arada çalışması ile elektrik veya termal gücü oluşturduğu sistemlerdir (Gupta ve ark,2007). Yenilenebilir kaynaklardan da oluşabilen hibrit sistemler şebekeye bağlı veya şebekeden bağımsız olarak çalışabilmektedir. Enerji iletim bölgelerine uzak mesafede ve kırsal yerleşimler enerji üretilebilimesi amacıyla şebekeden bağımsız sistemler dizel jeneratörlerle birlikte kullanılabilir. Özellikle uzak ve ulaşım güçlüğü yaşanan bölgelerde ulaşım maliyeti ve yakıt fiyatı artışı sebebiyle fiyat avantajını yitirmektedir (Nayar ve ark,1989), (Bakirtzitz ve Gavanidou,1992).



Şekil. Rüzgar- Güneş hibrit enerji üretim sistemi

## MATERYAL VE METOD

Araştırmanın materyali Trakya Bölgesinde bulunan Tekirdağ ilindeki çalışmalar oluşturmuştur. Tekirdağ ili, Trakya bölgesinde 26°40′- 28°10′ doğu boylamları ve 40°35′- 41°35′ kuzey enlemleri arasında yer almaktadır. Toplam yüzölçümü 621.788 ha'dır. Çorlu, Süleymanpaşa, Çerkezköy, Kapaklı, Ergene, Malkara, Saray, Hayrabolu, Şarköy, Muratlı ve Marmara Ereğlisi olmak üzere toplam 11 adet ilçesi bulunmaktadır (Anonim, 2007).




Şekil. Tekirdağ ilçeler haritası

Araştırmada sonuçlara ulaşmak için izlenen metod, Tekirdağ ilinin tüm ilçelerinin ayır ayrı rüzgar ve güneş enerjisi potansiyellerinin belirlenmesi ve bu potansiyellerin modern hidroponik seralarda kullanılabilmesinin belirlenmesidir. Bu amaçla tüm ilçelerin yıllık güneşlenme süreleri, global radyasyon değerleri ve toplam güneş radyasyonu analiz edilmiştir. Ilgili ilçelerde Rüzgar enerjisi potansiyeli, rüzgar hızı ve kapasite faktörü dağılımı ışığında, hibrit sistemlerin potansiyeli belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında Tekirdağ ilinin hangi bölgelerinde rüzgar - güneş hibrit sistemlerle su kültürü (hidoponik) seraların iklimlendirilebileceği ortaya konmuştur.

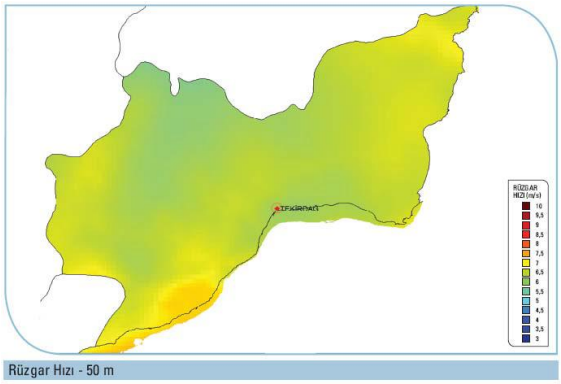
## BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırma kapsamında Tekirdağ ilinin bölgelerine göre rüzgar ve güneş enerji potansiyelleri ayrı ayrı belirlenmiştir. Belirlenen bu değerlerin her ikisinin aynı anda hibrit olarak kullanım imkanları elde edilen bu değerlere göre oluşturulmuştur.

### Rüzgar Enerjisi Potansiyeli

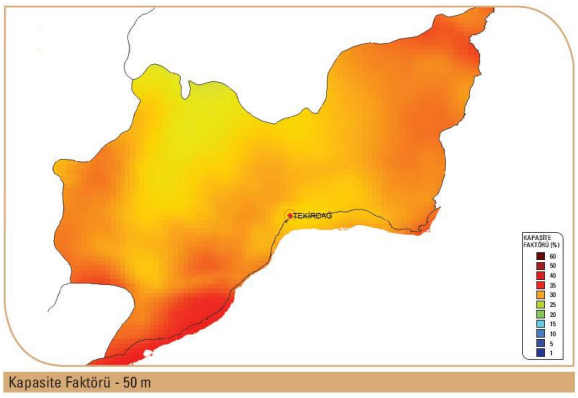
Bir bölgenin rüzgar hızı, haritalandırma sistemindeki renklendirmelere göre belirlenmektedir. Rüzgar Hız dağılımı haritalarına göre açık ve koyu mavi renkler rüzgar hızı açısından düşük, yeşil bölgeler orta seviyede ve sarı – kırımızı bölgeler iyi olarak adlandırılmaktadır. Tekirdağ ilçeleri rüzgar hızı dağılımı açısından

değerlendirildiğinde genelde orta seviyede potansiyele sahip olu, sarı renklendirilmiş olan Şarköy başta olmak üzere, Çerkezköy, Kapaklı, Saray, Malkara ve Hayrabolu nispeten daha fazla rüzgar hızına sahiptir.




Şekil. Tekirdağ ilinin rüzgar hızı dağılım haritası (Anonim,2019)

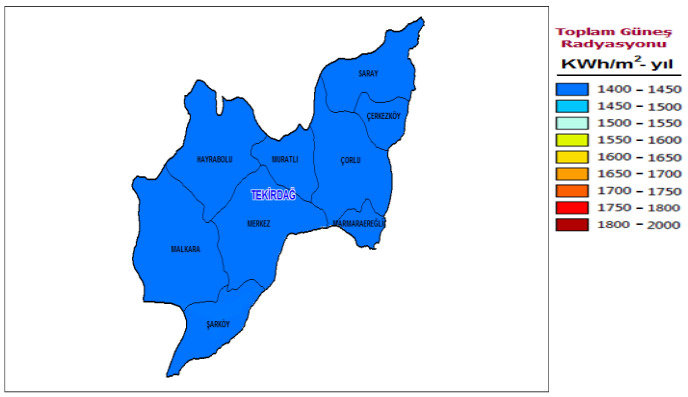
Rüzgar enerjisi potansiyeli açısından değerlendirdiğimiz bir diğer özellik kapasite faktörü dağılımı haritasıdır. Ekonomik olarak iyi seviyede rüzgar enerjisinden faydalanmak için harita renklerinin kırmızı ve kırmızının koyu tonlarının bulunduğu bölgelerin mevcut olması gerekmektedir. Tekirdağ Bölgesinde kapasite faktörü açısından rüzgar enerjisini değerlendirdiğimizde Şarköy ilçesinin en iyi düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çerkezköy, Kapaklı, Saray ve Malkara ilçelerinde de Şarköy'ü takip eden seviyelerde rüzgar kapasite faktörünün varlığı belirlenmiştir.




Şekil. Tekirdağ ilinin rüzgar kapasite dağılımı haritası (Anonim,2019)

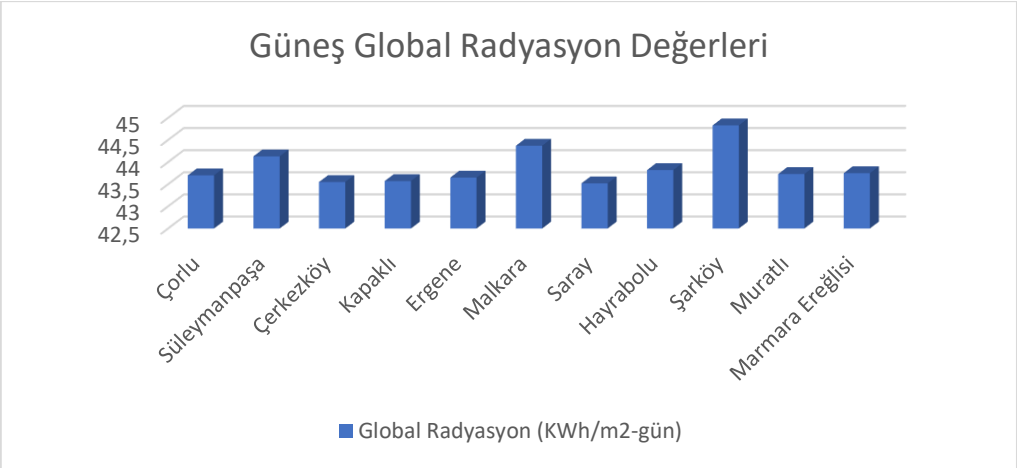
**Güneş Enerjisi Potansiyeli**

Tekirdağ ili genel olarak değerlendirildiğinde güneş enerjisi açısından çok yüksek değerlere sahip değildir. Çok yüksek değerler olmamakla birlikte hemen hemen her ilçede güneş enerjisinden yararlanma imkanları bulunmaktadır.



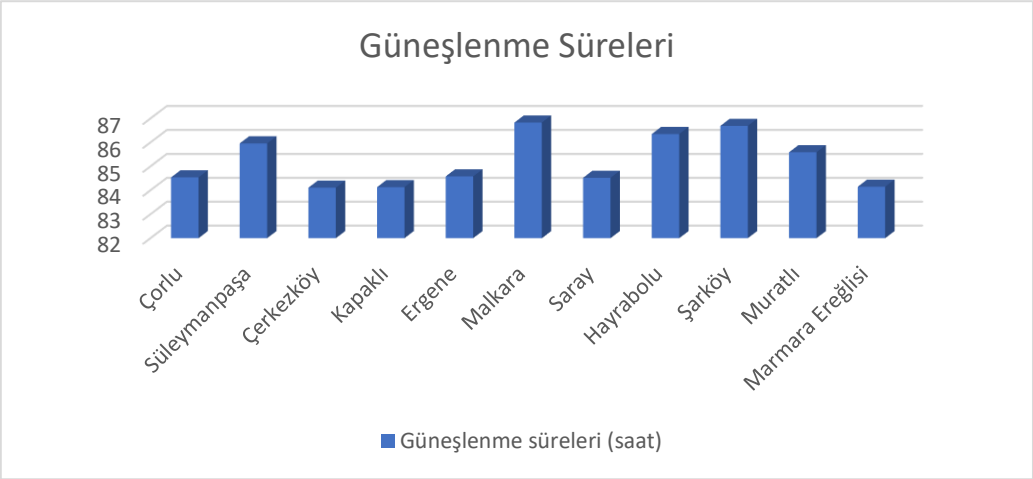

Şekil. Tekirdağ ilinin genel güneş enerjisi potansiyeli (Anonim,2019)

Tekirdağ ilinin tüm ilçelerinin ayrı ayrı yıllık olarak toplam global radyasyon değeri ve güneşlenme süreleri belirlenmiştir. Hesaplanan yıllık değerlere göre en iyi değer Şarköy'de bulunmuş olup, Malkara, Süleymanpaşa ve Hayrabolu diğer iyi değerlere sahip olan ilçelerdir. Diğer ilçeler birbirine çok yakın değerler almıştır.




Şekil. Tekirdağ ilçeleri güneş global radyasyon değerleri (Anonim,2019)

İlçeler güneşlenme süresi olarak kıyaslandığında en uzun güneşlenme süresi olan ilçeler birbirine çok yakın değerler alan Malkara ve Şarköy ilçeleridir. Hayrabolu, Muratlı ve Süleymanpaşa bu ilçelerden sonraki en iyi güneşlenme süresi olan ilçelerdir. Bu bölgeler dışındaki ilçelerin güneşlenme süreleri birbirine çok yakındır.




Şekil. Tekirdağ ilçeleri güneşlenme süreleri (Anonim,2019)

## SONUÇ

Su kaynakları ve tarım alanlarının her geçen gün azaldığı günümüz koşullarında, dünyanın tüm ülkelerinde artan nüfusun beslenme ihtiyacının karşılanması için yeni sistemler geliştirilmektedir. Bu sistemlerden biri olan ve iklim koşullarına bağlı olmaksızın bitkisel üretime olanak sağlayan seralarda da yeni sistemler geliştirilmektedir. Bu sistemlerden olan hidroponik (su kültürü) seralarında topraksız şekilde modern seralarda bitki besin maddeleri ve su ile hazırlanan çözelti içerisinde bitkisel üretim yapılmaktadır. Bu şekildeki üretimde iklim koşullarının yetiştirilen bitkilerin isteklerine göre optimum şekilde sağlanması gerekmektedir. Sera içerisindeki iklim koşullarının sağlanması da enerji ile ilgilidir. Yapılan çalışmada Tekirdağ koşullarında hidroponik (su kültürü) sistemlerle kurulacak seralarda yapılacak olan iklimlendirmenin rüzgar-güneş hibrit sistemlerle sağlanabilirliği araştırılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1- Rüzgar hızı açısından değerlendirildiğinde Şarköy başta olmak üzere Çerkezköy, Kapaklı, Saray, Malkara ve Hayrabolu nispeten daha fazla rüzgar hızına sahiptir.
2- Rüzgar enerji potansiyeli açısından kapasite faktörü olarak kıyaslandığında Şarköy ilçesinin en iyi düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çerkezköy, Kapaklı, Saray ve Malkara ilçelerinde de Şarköy'ü takip eden seviyelerde rüzgar kapasite faktörünün varlığı belirlenmiştir.
3- Tekirdağ ili genel olarak değerlendirildiğinde güneş enerjisi açısından çok yüksek değerlere sahip değildir. Çok yüksek değerler olmamakla birlikte hemen hemen her ilçede güneş enerjisinden yararlanma imkanları bulunmaktadır.
4- Global rasyasyon açısından en iyi değer Şarköy'de bulunmuş olup, Malkara, Süleymanpaşa ve Hayrabolu diğer iyi değerlere sahip olan ilçelerdir. Diğer ilçeler birbirine çok yakın değerler almıştır.
5- İlçeler güneşlenme süresi olarak kıyaslandığında en uzun güneşlenme süresi olan ilçeler birbirine çok yakın değerler alan Malkara ve Şarköy ilçeleridir. Hayrabolu, Muratlı ve Süleymanpaşa bu ilçelerden sonraki en iyi güneşlenme süresi olan ilçelerdir.

Sonuç olarak Tekirdağ bölgesinde rüzgar-güneş hibrit sistemlerle hidroponik (su kültürü) seralarında iklimlendirme sistemlerinin sağlanması mümkündür. Bu şekilde istenilen zamanda istenilen bitkisel ürün modern seralardan elde edilebilmesinin yanında yenilenebilir enerjilerden faydalanarak gıda teminin sağlanması da mümkün olacaktır.

## KAYNAKLAR

Anonim, 2007. Tekirdağ İli Su Kaynakları Kullanımı ve Yönetimi, Tekirdağ Valiliği Yayınları, Tekirdağ.

Anonim, 2019. Enerji İşleri Genel Müdürlüğü, Yenilenebilir Enerji Potansiyeli http://www.yegm.gov.tr/MyCalculator/pages/59.aspx (02.02.2020)

Bakirtzis, A.G., and Gavanidou, E.S., "Optimum operation of a small autonomous system with unconventional energy sources", Electric Power Systems Research, 23, (1992), 93.

Gupta, A., Saini, R.P., and Sharma, M.P., "Design of an optimal hybrid energy system model for remote rural area power generation", ICEE.07 International Conference, Hong Kong, (2007), 1-6.

Jensen, M.H., "Hydroponics" ***Hortscience,*** 32(6) 1997

Nayar, C.V., Lawrance, W.B., and Phillips, S.J. "Solar/Wind/Diesel hybrid energy systems for remote areas", Proceedings of IEEE, (1989), 2029-2034.

Sevgican, A., Örtüaltı Sebzeciliği (Topraksız Tarım). Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 526, 476s, Bornova, İzmir, 1999

Winsor, G.W., Schwarz M., 1990. Soilless culture for Horticultural Crop Production. FAO Plant Production and Protection Paper, No: 101, Rome, pages 188, 2007

# Diyarbakır Eğil'de petrolle kirletilmiş topraktan petrol parçalayan bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması

Merve Demirtaş Aksu[1], Kemal Güven[1*], Fatma Matpan Bekler[2]

[1] Dicle University, Science Faculty, Molecular Biology and Genetics Department, 21280 Diyarbakır,Turkey.

[2] Dicle University, Science Faculty, Biology Department, 21280 Diyarbakır,Turkey.

*Corresponding author: fmatpan@dicle.edu.tr

## Özet

Petrol, tüm ülkelerdeki enerji taleplerini karşılamak için önemli bir stratejik kaynaktır. Bununla birlikte, petrol kullanımından dolayı petrol ile kirlenmiş alanlarda sürekli ve kalıcı çevresel riskler vardır. Petrol hidrokarbon parçalayıcı bakteriler, petrol kirleticilerinin tedavisi için adaydır. Bu çalışmada, Diyarbakır'ın Eğil İlçesi'nin 30-35 km kuzeydoğusunda yer alan petrolle kirlenmiş toprak alanlarından petrol parçalayan bakteriler izole edilmiştir. Elde edilen bakterilerin koloni morfolojisi ve hücre morfolojisi incelendi. Ayrıca biyokimyasal (sitrat, oksidaz, üreaz, jelatin, tirozin, nişasta, indol, katalaz), fizyolojik (hareketlilik testi, optimum büyüme süresi, sıcaklık, pH), antibiyogram testleri ve MALDI-TOF MS (Matrix destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon süresi) analizi yapıldı. İzolatlar PD2-1, PD2-2, PD2-3 olarak kodlandı. Hidrokarbon parçalayıcı mikroorganizmaları taramak için n-heptan, n-pentadekan, n-hekzadekan ve skualen gibi hidrokarbonlar test edildi. MALDI-TOF MS analizi ve diğer tarama testlerine göre, suşların *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Acinetobacter calcoaceticus* ile yakından ilişkili olduğunu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Petrol-kirliliği, petrol-parçalanması, *Acinetobacter, Pseudomonas*

## Isolation and identification of petroleum-degrading bacteria from petroleum contaminated soil in Eğil, Diyarbakır

## Abstract

Petroleum is an important strategic resource to meet energy demands in all countries. However, there are persistent and permanent environmental risks in petroleum-contaminated areas due to petroleum use. Petroleum hydrocarbon degrading bacteria are candidates for the treatment of petroleum pollutants. In this study, petroleum degrading-bacteria were isolated from petroleum-contaminated soil areas located 30-35 km northeast of Eğil district of Diyarbakır. Both colony and cell morphology bacteria were examined, as well as carrying out biochemical (citrate, oxidase, urease, gelatine, tyrosine, starch, indole, catalase), physiological (motility test, optimum growth time, temperature, pH), antibiogram tests and MALDI-TOF MS (Matrix assited laser desorption ionization time flight mass spectrometry) analysis. The bacterial strains were designated as PD2-1, PD2-2, PD2-3. In order to screen hydrocarbon degrading microorganisms, several hydrocarbons, including, n-heptane, n-pentadecane, n-hexadecane and squalene were tested. According to MALDI-TOF MS analysis and other screening tests showed that the strains capable of degrading petroleum were found to be closely related to *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* and *Acinetobacter calcoaceticus.*

**Key words:** Petroleum contaminated soil, petrol degrading-bacteria, *Acinetobacter, Pseudomonas*

## GİRİŞ

Günümüzde en büyük çevresel sorunlardan biri petrokimya endüstrisi ile ilgili faaliyetlerden kaynaklanan hidrokarbon kirlenmesidir. Petrol ürünlerinden kaynaklanan kirlilik çevre açısından önemlidir. Petrolle kirlenmiş toprakların ıslahında yaygın olarak kullanılan teknoloji pahalıdır ve kirletici maddelerin eksik ayrışmasına neden olabilir (Das and Chandran, 2011). Biyoremediasyon, çeşitli metabolik yetenekleri nedeniyle kirleticileri detoksifiye etmek veya uzaklaştırmak için mikroorganizmaların kullanılması olarak tanımlanmaktadır ve petrol endüstrisi ürünleri de dahil olmak üzere birçok çevresel kirleticinin uzaklaştırılması ve bozulması için gelişen bir yöntemdir (Medina-Bellver ve ark. 2005). Doğal mikroorganizma popülasyonları tarafından biyoremediasyon petrol ve diğer hidrokarbon çevreden uzaklaştırılabileceği ilk mekanizmalardandır (Ulrici, 2000) ve diğer iyileştirme yöntemlerine göre ucuzdur (Leahy ve Colwell, 1990). Petrol hidrokarbonlarının biyodegradasyonu, hidrokarbonların miktarına bağlıdır. Petrol hidrokarbonları dört sınıfa

ayrılabilir: doymuşlar, aromatikler, asfaltenler (fenoller, yağ asitleri, ketonlar, esterler ve porfirinler) ve reçineler (piridinler, kinolinler, karbazoller, sülfoksitler ve amidler) (Colwell ve ark. 1977). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp., *Acinetobacter lwoffi*, *Flavobacterium* sp., *Micrococcus roseus* ve *Corynebacterium* sp. gibi bakterilerin ham petrolü parçaladığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada petrolle kirletilmiş topraklardan petrol ve hidrokarbonların parçalanmasını sağlayan bakterilerin izole edilmesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Bu çalışmada Diyarbakır'ın Eğil ilçesi yolunda yaklaşık 30-35 km kuzeydoğuda yer alan petrolle kirlenmiş toprak ve çamur alanlarındaki petrol istasyonundan toprak ve çamur örnekleri kullanıldı.

### Bakteri izolasyonu

Diyarbakır ili Eğil ilçesi yolunda petrolle kirlenmiş alandan alınan toprak ve çamur örnekleri soğuk ve steril şartlarda muhafaza edilerek laboratuvara getirildi. Toprak ve çamur örneklerinden birer gram tartıldı ve tartılan bu örneklerin ekimi için ham petrolü içeren minimal besiyeri (BSM) hazırlandı. 5.0 mL sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) (19.7 g/L $K_2HPO_4$, 8.7 g/L $KH_2PO4$, 3.744 g/L $Na_2HPO4$ .7H2O, 5.0 g/L $NH_4Cl$), 3.0 mL magnezyum sülfat çözeltisi (22.5 g/L $MgSO_4$), 1.0 mL kalsiyum klorür çözeltisi (36.4 g/L $CaCl_2$), 1.0 mL ferrik klorür çözeltisi (0.25 g/L $FeCl_3$), 1.0 mL iz mineral element çözeltisi ($MnSO_4$ (39.9 mg/L), $ZnSO_4$. $7H_2O$ (42.8mg/L) ve $(NH_4)_6$ $Mo_7O_{24}$ .$4H_2O$ (34.7 mg/L). Ham petrol 0.2 µm por çapında olan steril filtrelerden geçirildi ve otoklavda steril edildi. Daha sonra BSM besiyerlerine ortamda % 1 olacak şekilde ham petrol eklendi. Petrolü kullanan bakterilerin seçimi için tartılan toprak ve çamur örnekleri % 1 ham petrol içeren besiyerlerine inoküle edildi ve 35°C'de 120 rpm'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. 2 gün sonunda bu örnekten 1 mL alınıp tekrar aynı besi ortamına aktarıldı ve bu işlem 3 kez daha tekrarlandı. Daha sonra bu besiyerlerinden 1 mL alınıp zenginleştirilmiş Nutrient Broth (NB) besi ortamına inoküle edildi. 35 °C'de 120 rpm'de 24 saatlik inkübasyon sonrası tek koloni elde etmek için, $10^{-1}$-$10^{-4}$ oranında seyreltmeler yapılarak Nutrient Broth agar (NBA) katı besiyerine ekim yapıldı ve 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra NBA petrilerde üreyen bakteri kolonileri incelenerek farklı görünüme sahip kolonilerden tek koloni alınıp çizgi ekim yapılarak saf kültür elde edildi.

### İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu

Seçilen koloniler fenotipik olarak şekil, boyut, renk, yüzey, görünüş, yükseklik, hücre duvarı, ışık ve kıvam vb. temel alınarak karakterize edildi. Gram boyama, Dussault (1955) 'e göre gerçekleştirilmiştir ve hücre morfolojisini ışık mikroskobu ile incelendi. Sporların oluşumu, malaşit yeşili boyaması ile mikroskopik gözlemlerle test edildi. Seçilen izolatların farklı biyokimyasal özellikleri 1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride kullanılarak oksidaz aktivitesi, % 3 $H_2O_2$ kullanılarak katalaz aktivitesi, % 0.2 nişasta kullanılarak nişasta hidrolizi, % 0.1 jelatin kullanılarak jelatin hidrolizi, Simmons' citrate agar kullanılarak sitritaz ve üre agar kullanılarak üreaz aktivitesi, indol, tirozin ve hareketlilik (motilite) gibi testleriyle belirlendi. Sıcaklığın büyüme üzerine etkisini belirlemek için steril edilen NB sıvı besiyerine (pH 7.0) bakteriler inoküle edilerek farklı sıcaklıklarda (20-50 °C) 24 saat inkübe edildi. Daha sonra spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapılarak büyüme için optimum sıcaklık belirlendi. PH'ın büyüme üzerindeki etkisini belirlemek için 4.0-11.0 aralığında, sitrik asit (pH 4.0-6.0 için), Tris-HCl (pH 6.0-9.0 için) ve glisin-NaOH (pH 10.0–11.0 için) kullanılarak NB sıvı besiyeri hazırlandı ve steril edildi. Farklı pH'da hazırlanan besiyerlerine bakteriler ayrı ayrı inoküle edildi ve belirlenen optimum sıcaklıklarında 24 saat inkübe edildi. Optimum pH, spektrofotometre kullanılarak 600 nm'de ölçüm yapılarak belirlendi.

### Antibiyotik duyarlılık testi

Antibiyotik duyarlılık testi Murray ve ark.'na (1995) göre test edildi. İzole edilen bakteriler NB sıvı besiyerinde kültüre edildi. Gecelik kültürü hazırlanan bakteriler 5 ml steril % 0.9 tuz çözeltisi kullanılarak toplandı, spektrofotometre kullanılarak absorbansı 0.5 McFarland bulanıklık standardına (5 x 105 CFU / mL) ayarlandı. Bakteriler ayrı ayrı NBA besiyerine inoküle edildi ve ortam yüzeyinin kuruması için 3-5 dk. bekletildi. Fucidic acid (10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Kanamycin (5 µg), Novobiocin (5 µg), Penicillin (2, 10 units), Nystatin (100 units), Gentamicin (10 µg), Streptomycin (10 µg), Tilmecocin (15 µg), Bacitracin (10 unit), Ampicillin (10 µg), Lincomycin (15 µg), Tetracyclin (30 µg), Neomycin (10 µg) antibiyotik diskleri kültür yayılan NBA petrilerinin üzerine belirli aralıklarla bırakıldı 2 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon

süresi sonunda antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülerek antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildi.

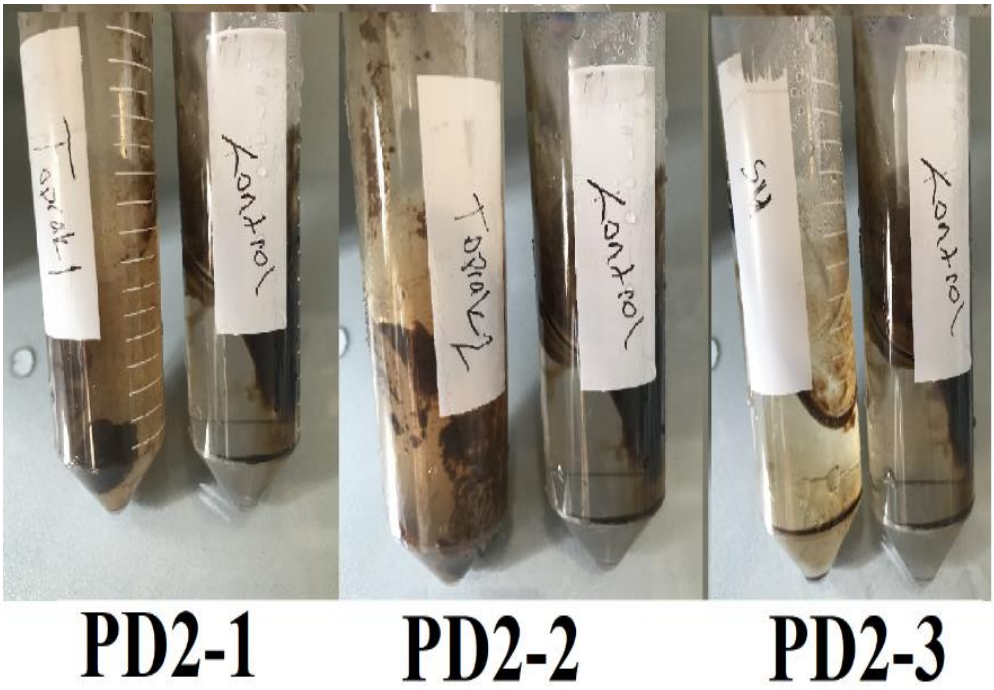
**Hidrokarbonların varlığında bakteriyel belirlenmesi**

Hidrokarbon parçalayıcı mikroorganizmaları taramak için n-heptan ($C_7H_{16}$), n-pentadekan ($C_{15}H_{32}$), n-hekzadekan ($C_{16}H_{34}$) ve skualen ($C_{30}H_{50}$) dahil olmak üzere çeşitli hidrokarbonlar test edildi. 25 ml BSM içeren besi yerine farklı hidrokarbonlar % 1'lik konsantrasyonda eklendi ve bakteriler ayrı ayrı inoküle edilerek 30 °C'de çalkalamalı su banyosunda 120 rpm'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bakterilerin hidrokarbonları kullanımı 600 nm'de (OD 600) spektrofotometre ile ölçüldü. Bakterilerin kullandıkları hidrokarbonların farklı konsantrasyonları (% 0.25-2.0) aynı yöntemle denendi.

**BULGULAR ve SONUÇ**

Bu çalışmada, Eğil'deki petrolle kirletilmiş alandan alınan toprak örneklerinden petrol kullanan en farklı 3 izolat izole edilmiştir.

Petrol içeren besi yerinde üretilen ve petrolü kullanan izolatlara PD2-1, PD2-2, PD2-3 kodları verilerek Dicle Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarında gliserol içeren kriyotüplerde -80 ° C'de saklandı. Bu izolatların tanımlanmasına yönelik fizyo-biyokimyasal testler yapıldı.



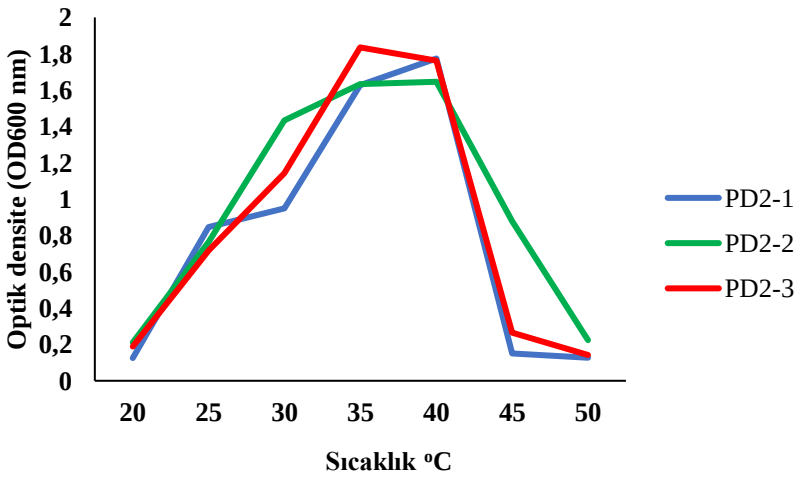

**Şekil 1.** İzolatların petrol kullanımı

Tablo 1'de de görüldüğü gibi elde edilen izolatardan PD2-1; Gram (-), basil, sitrat, oksidaz, üreaz, indol, katalaz aktivitesi pozitif, jelatin ve nişasta hidrolizi pozitif iken, tirozin hidrolizi negatiftir. PD2-2 izolatı; Gram (+), basil, sitrat, oksidaz, üreaz, indol, katalaz aktivitesi pozitif, jelatin, tirozin ve nişasta hidrolizi pozitiftir. PD2-3 izolatı; Gram (-), kokobasil, oksidaz, üreaz, katalaz aktivitesi pozitif, sitrat, indol aktivitesi negatif, jelatin, tirozin ve nişasta hidrolizi negatiftir.

Elde edilen izolatların petrol içeren besi yerinde petrolü kullanarak ürediği belirlendi ve bu izolatların üremesi için optimum sıcaklık ve pH denendi.

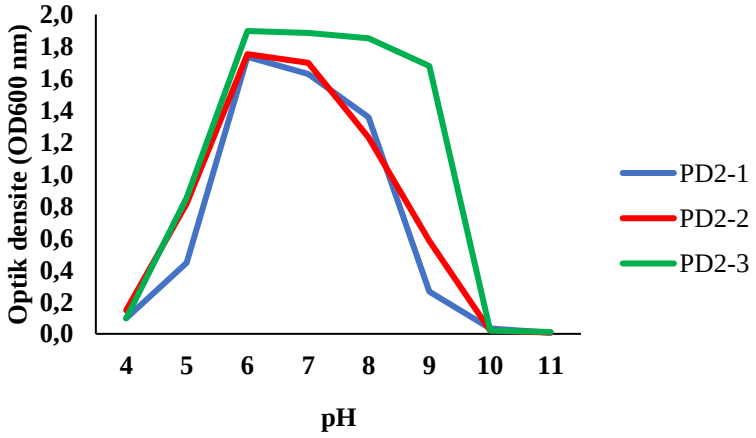
| Tablo 1. Biyokimyasal Test sonuçları | | | |
|---|---|---|---|
| | **PD2-1** | **PD2-2** | **PD2-3** |
| Gram Boyama | (-) | (+) | (-) |
| Hücre şekli | Basil | Basil | Kokobasil |
| Sitrat | + | + | - |
| Oksidaz | + | + | + |
| Üreaz | + | + | + |
| Jelatin | + | + | - |
| Tirozin | - | + | - |
| Nişasta | + | + | + |
| İndol | + | + | - |
| Katalaz | + | + | + |

(+): pozitif sonuç, (-): negatif sonuç




**Şekil 2.** İzolatların optimum üreme sıcaklığı

Elde edilen izolatların optimum üreme sıcaklığına 20-50 ºC arasında bakıldı. PD2-1'in 20-45 ºC arasında ürediği ve optimum sıcaklığın 40 ºC, PD2-2 izolatının 20-50 ºC arasında ürediği ve optimum sıcaklığın 40 ºC, PD2-3 izolatının 20-45 ºC arsında ürediği ve optimum sıcaklığın 35 ºC olduğu belirlendi (Şekil 2).




**Şekil 3.** İzolatların optimum üreme pH'sı

Elde edilen izolatların optimum üreme pH'sına 4.0-11.0 arasında bakıldı. PD2-1 PD2-2 ve PD2-3'ün 4.0-9.0 arasında ürediği ve optimum pH'nın 6.0 olduğu belirlendi (Şekil 3).

Tablo 2'de elde edilen izolatların antibiyogram sonuçları görülmektedir. Buna göre; PD2-1 izolatının Tilmecocin, Gentamicin, Tetracyclin, Streptomycin, Ampicilin, Chloramphenicol antibiyotiklerine duyarlı, Lincomycin, Penicilin, Bacitracin antibiyotiklerine yarı duyarlı ve Kanamycin, Neomycin, Novobiocin, Fucidic acid, Nystatin antibiyotiklerine dirençli olduğu belirlenmiştir.

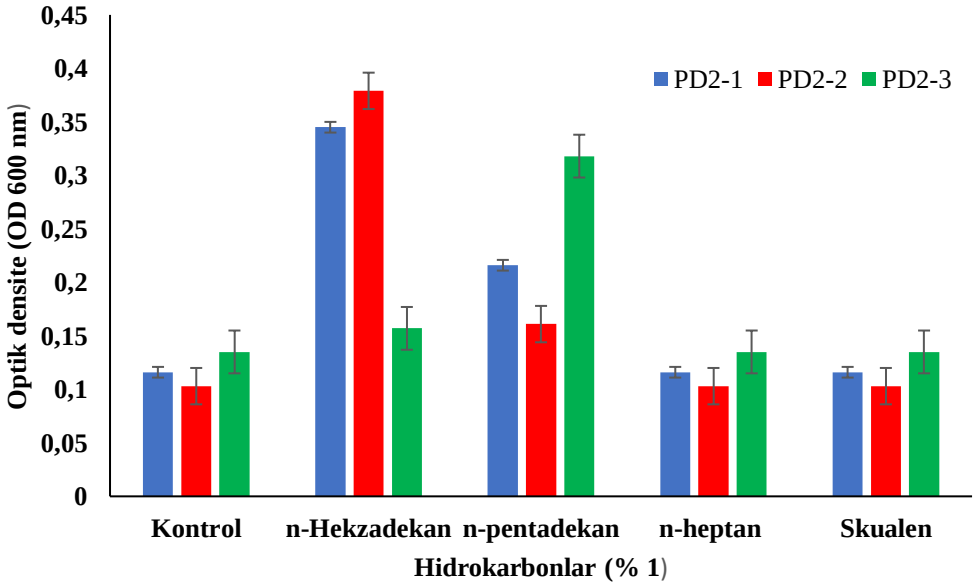
PD2-2 izolatının antibiyogram sonuçlarına göre; Kanamycin, Tilmecocin, Gentamicin, Streptomycin, Tetracyclin ve Novobiocin antibiyotiklerine duyarlı, Lincomycin, Penicillin, Neomycin, Bacitracin, Fucidic acid, Nystatin, Ampicillin ve Chloramphenicol antibiyotiklerine dirençli olduğu belirlenmiştir.

PD2-3 izolatının antibiyogram sonuçlarına bakıldığında Kanamycin, Gentamicin, Streptomycin, Tetracyclin Neomycin antibiyotiklerine duyarlı, Tilmecocin, Lincomycin, Penicillin, Neomycin, Bacitracin, Fucidic acid, Nystatin, Ampicillin ve Chloramphenicol antibiyotiklerine dirençli olduğu belirlenmiştir.

MALDITOF MS (Matriks destekli lazer desorpsiyonlu uçuş kütle spektrometrisinin iyonizasyon zamanı) hızlı, ucuz ve mikroorganizmaların tanımlanmasında son zamanlarda kullanılan doğru sonuçlar veren yeni bir tekniktir (Croxatto ve ark. 2012, Wieser ve ark. 2012). Bu çalışmada elde edilen suşların MALDI-TOF MS ile analiz sonuçlarına göre; PD2-1 suşunun *Pseudomonas aeruginosa*, PD2-2 suşunun *Acinetobacter calcoaceticus* ve PD2-3 suşunun *Pseudomonas putida* türleriyle yakından ilişkili olduğunu belirlenmiştir.

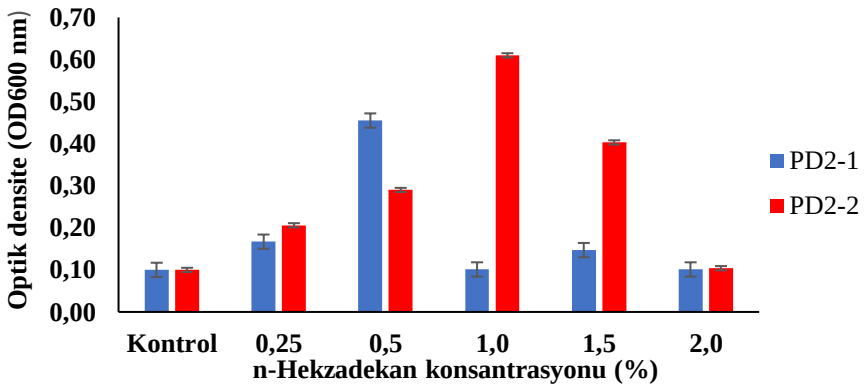
n-Alkanlar, naftenik veya aromatik bileşiklerden ziyade birçok mikrobiyal tür tarafından biyolojik olarak parçalanabilen petrol hidrokarbonlarındandır (Acer ve ark. 2016).

| Tablo 2. Antibiyogram Sonuçları | | | |
|---|---|---|---|
| **Antibiyotikler** | **PD2-1** | **PD2-2** | **PD2-3** |
| Kanamycin (5 µg) | 4±0.1 | 23±0.15 | 19±0.15 |
| Tilmecocin (15 µg) | 19 ±0.15 | 19±0.1 | 6±0.1 |
| Gentamicin (10 µg) | 13±0.3 | 17±0.3 | 20±0.2 |
| Streptomycin (10 µg) | 18±0.1 | 19±0.1 | 17±0.15 |
| Lincomycin (15 µg) | 11±0.1 | 0 | 0 |
| Penicillin (2, 10 units) | 10±0.1 | 0 | 0 |
| Tetracyclin (30 µg) | 28±0.15 | 24±0.15 | 14±0.1 |
| Neomycin (10 µg). | 3±0.1 | 4±0.1 | 12±0.15 |
| Novobiocin (5 µg) | 0 | 20±0.1 | 9±0.1 |
| Bacitracin (10 unit) | 11±0.1 | 0 | 0 |
| Fucidic acid (10 µg) | 0 | 0 | 0 |
| Nystatin (100 units) | 0 | 0 | 0 |
| Ampicillin (10 µg) | 13±0.1 | 0 | 0 |
| Chloramphenicol (30 µg) | 20±0.1 | 0 | 0 |




**Şekil 4.** İzolatların farklı hidrokarbonları kullanımı

Petrol varlığında üreyen izolatların hidrokarbonlardan n-heptan, n-pentadekan, n-hekzadekan ve skualen kullanımı denenmiştir. PD2-1 ve PD2-2 suşlarının n-hekzadekan varlığında üremelerinin kontrol ile karşılaştırıldığında yaklaşık 3 kat fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). PD2-3 suşunun kontrolle kıyaslandığında önemli bir fark belirlenmemiştir. Bu nedenle, PD2-1 ve PD2-2 suşlarının n-hekzadekanın farklı konsantrasyonlarındaki (% 0.25-2.0) üreme potansiyeli araştırdı.




Şekil 5. İzolatların hekzadekan kullanımı

Şekil 5'te görüldüğü gibi PD2-1 ve PD2-2 suşlarının n-hekzadekanın farklı konsantrasyonlarında üreme potansiyeline bakıldığında PD2-1 suşu % 0,5, PD2-2 suşu ise % 1'lik n-hekzadekan varlığında en iyi üreme göstermektedir.

Petrol kontaminasyonunun mikrobiyal biyoremediasyonu için, çeşitli ham petrol ve hidrokarbonların parçalanması çok önemlidir. Bununla ilgili daha önceden çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa* (Shailubhai ve ark. 1985; Zhang ve ark., 2005; Song ve ark. 2006; Wu ve ark., 2018), *Acinetobacter calcoaceticus* (Marin ve ark. 1994; Lal and Khanna 1996;Acer ve ark. 2016) gibi birçok çalışma, bakterilerin hidrokarbonları parçalama yeteneklerini ortaya çıkarmıştır. Petrolle kirletilmiş topraklardan izole edilen PD2-1 ve PD2-2 suşlarının n-hekzadekanı parçalayabilmesinden dolayı petrol ile kirlenmiş alanların biyolojik olarak iyileştirilmesi için bu suşların kullanılabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

Acer Ö., Güven K., Matpan Bekler F., Gül-Güven R. 2016. Isolation and characterization of long-chain alkane–degrading Acinetobacter sp. BT1A from oilcontaminated soil in Diyarbakır, in the Southeast of Turkey, Bioremediation Journal, 20:1, 80-87.

Colwell RR., Walker JD., and Cooney JJ. 1977.Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment, Critical Reviews in Microbiology, 5(4):423–445.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 36(2): 380-407.

Das N. and Chandran P. 2011 Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview, Biotechnology Research International, 2011, Article ID 941810, 13 pages.

Dussault, HP. 1955. An improve technique for staining for halophilic bacteria. Journal of Bacteriology 70: 484-485.

Lal B, Khanna S. 1996. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans.* J Appl Bacteriol. 81(4):355-62.

Leahy JG. and Colwell RR. 1990 Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, Microbiological Reviews, 54(3):305–315.

Marín MM., Ortiz ML., Laborda F.1994. Degradation of oil derivatives by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. Microbiologia. 10(1-2):159-68.

Medina-Bellver JI., Marín P., Delgado A., Rodríguez-Sánchez A., Reyes E., Ramos JL., and Marqués S. 2005. Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill, Environmental Microbiology, 7(6):773–779.

Murray, PR., Baron, EJ., Pfaller, MA., Tenover, FC, Yolke, RH. 1995. Manual Clinical Microbiology. ASM, Washington DC., pp.1356.

Ulrici W. 2000. Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants, in Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology, H. J. Rehm and G. Reed, Eds., 11:5–42.

Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond. Appl Microbiol Biotechnol. 93(3):965-74.

Shailubhai K., Rao NN., Modi VV. 1985. Degradation of petroleum industry oil sludge by *Rhodotorula rubra* and *Pseudomonas aeruginosa.* Oil and Petrochemical Pollution. 2(2):133-136.

Song U., Hua Z., Lı H., Chen J. 2006 Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Two *Pseudomonas aeruginosa* Strains with Different Uptake Modes, Journal of Environmental Science and Health, Part A, 41:4, 733-748

Wu T., Xu J., Xie W., Yao Z., Yang H., Sun C., Li X. 2018. *Pseudomonas aeruginosa* L10: A Hydrocarbon-Degrading, Biosurfactant-Producing, and Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated From a Reed (*Phragmites australis*). *Frontiers in microbiology*, *9*, 1087.

Zhang GL., Wu YT., Qian XP., Meng Q. 2005. Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *6*(8), 725–730.

# Probiotic effects of *Bifidobacterium* species

Esra Şentürk*[1], Pınar Şanlıbaba[1]

[1]Ankara University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Ankara, Turkey.

*Corresponding author e-mail: esra.snturk@gmail.com

## Abstract

Probiotics are defined as living microorganisms that provide health benefits to the host when administered in adequate amounts. *Bifidobacterium* is one of the most widely used and studied probiotic bacteria among the various probiotic bacteria. *Bifidobacterium* genus which have high GC content, belong to *Bifidobacteriumceae* family, *Bifidobacteriumles* order and *Actinobacteria* class are Gram-positive, immobile, non-spore-forming, anaerobic microorganisms. Some *Bifidobacterium* strains are considered probiotic microorganisms due to their beneficial effects and used as bioactive agents in functional foods, especially dairy products, as well as in food supplements and pharmaceutical products, alone or in combination with other microbial / microbial substrates. *Bifidobacterium* genus consists of 70 species and 10 subspecies. *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* species are important species in terms of probiotic properties. *Bifidobacterium* are able to perform protective intestinal actions through various mechanisms and also show promising progress in the areas of treatment. As probiotic agents, *Bifidobacterium* have been studied for their effectiveness in the prevention and treatment of a broad spectrum of anima1 and/or human gastrointestinal diseases such as colonic transit disorders, intestinal infections and cancer. *Bifidobacterium* are commercially used as probiotic agents due to their health benefits and GRAS (Generally Recognized as Safe) status. *Bifidobacterium* with probiotic properties are found in the natural flora of the human intestinal tract and are used in the production of many fermented dairy products due to their various dietary and therapeutic properties. It is known that there are more than 70 products containing *Bifidobacterium* worldwide and that *Bifidobacterium* are widely used as health promoting microorganisms in many functional foods. Therefore, it is important to investigate and know the probiotic characteristic of *Bifidobacterium*. The aim of this review is to focus on the probiotic effects of *Bifidobacterium*.

**Keywords:** *Bifidobacterium*, Probiotics, Food, Health.

## INTRODUCTION

*Bifidobacterium*, one of the dominant commensal bacteria species in the intestine of children and adults, are known to colonize the gastrointestinal (GI) system within a week after birth (Hussain et al., 2020). Members of the genus *Bifidobacterium* are the most dominant species found in the intestines of breastfed babies and are often preferred as probiotic components due to their effects in maintaining the intestinal microflora balance (Arboleya et al., 2016).

Probiotics are living microorganisms, mostly bacteria, that benefit by colonizing the gut. The best known and most widely used probiotic microorganisms are bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* (Presti et al., 2015; O'Callaghan and van Sinderen, 2016). The *Bifidobacterium* genus is the primary microbe that colonizes the human gastrointestinal tract and has positive health effects on the host. Due to the generally accepted health benefits, *Bifidobacterium* that are frequently added to various functional foods are considered probiotics. Probiotic *Bifidobacterium* species play an important role in many situations such as prevention of intestinal infections, lowering cholesterol, lactose intolerance, constipation and allergic diseases. With these positive effects, *Bifidobacterium* species have great potential as probiotics (Turroni et al., 2009; Wei et al., 2016; Yakoob and Pradeep, 2019).

The traditional use of *Bifidobacterium* in fermented dairy products, their associated health benefits and the fact that some strains have GRAS (Generally Recognized as Safe) status increase their reliability in use as probiotic agents (Picard et al., 2005; O'Callaghan and van Sinderen, 2016). Due to the health benefits supported by clinical studies, *Bifidobacterium* are currently widely used as probiotic components in health-promoting functional commercial products (Bunešová et al., 2014; O'Callaghan and van Sinderen, 2016). It is used as a

probiotic in many food products, especially dairy products, baby food and dietary supplements (Russell et al., 2011). Common *Bifidobacterium* used as probiotics include *B. bifidum* and *B. longum* (Tham et al., 2012).

**_Bifidobacterium_ spp.**

*Bifidobacterium* genus bacteria, which are belong to family of *Bifidobacterium*ceae, *Bifidobacterium*les order and the *Actinobacteria* phylum, are common inhabitants of the gastrointestinal tract of animals, especially humans (Sheu et al., 2010; Otieno, 2011; Wei et al., 2012; Kwak et al., 2016).

*Bifidobacterium* genus bacteria are Gram positive, catalase negative, immobile, non-spore forming, anaerobic microorganisms with DNA containing high GC rate (55-67%) (Tham et al., 2012; Wei et al., 2012; Ventura et al., 2014). Their morphology is generally Y and V shaped, irregularly branched rod shaped (Lee and O'sullivan, 2010).

*Bifidobacterium* species are saccharolitic and produce acetic acid and lactic acid from various carbohydrates, but they do not produce carbondioxide gas (Russell et al., 2011; Inturri et al., 2017; Yakoob and Pradeep, 2019). Differ from *lactobacilli*, *Bifidobacterium* use the fructose-6-phosphate pathway in hexose metabolism (Alp and Aslım, 2009; Inturri et al., 2017). The average genome size of *Bifidobacterium* species is around 2.2 Mb (Papizadeh et al., 2017).

*Bifidobacterium* were first described in 1899 by Freshman Tissier, which isolates microorganisms in bifid morphology from the feces of healthy babies suckled with breast milk, and was named *Bacillus bifidus comminus*. It was named *Bacterium bifidus* as a result of the researches carried out by Castellani and Chalmers in 1920, and in later studies it was mentioned as *Lactobacillus bifidus* because of its morphological and physiological features very similar to those of *Lactobacilli*. Classified as a member of the *Lactobacillus* genus until recently, *Bifidobacterium* genus were shown in 1974 as a separate genus containing 11 species (Lee and O'sullivan, 2010; Ventura et al., 2014; Turroni et al., 2014).

So far, 70 species and 10 subspecies have been identified in the *Bifidobacterium* genus (Anonymous, 2020) and the most widely used species are; *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve* and *B. bifidum* (Meng, 2015).

Phylogenetic studies on the genus *Bifidobacterium* have identified a number of different clusters called *B. asteroides*, *B. pseudolongum*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. pullorum* and *B. boum* (Zhang et al., 2016). *Bifidobacterium* are the most abundant microorganisms found in the healthy baby intestine and constitute an important part of a healthy adult microbiota (Arboleya et al., 2016). In addition, *Bifidobacterium* species have been reported to live in seven different ecological niches such as human caries, human intestine, human vagina, intestines of animals, guts of honeybees, wastewater and fermented milk. *B. adolescentis*, *B.* angulatum, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum* subsp. *longum* and *infantis*, *B. pseudocatenulatum* and *B. scardovii* named ten species were isolated from humans. Representatives of human intestinal origin are *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* and *B.* pseudo*catenulatum* species. Animal-derived species include *B. pseudolongum*, *B.* thermophilus and *B. animalis*. *B. minimum* and *B. subtile* were detected only in sewers (Russell et al., 2011). *Bifidobacterium* species predominantly found in the intestinal natural microflora constitute 25% of adult feces and 80% of infant feces (Picard et al., 2005; Yakoob and Pradeep, 2019).

In the period from childhood to old age, the existing *Bifidobacterium* species changes with age. Generally, *B. longum*, *B. breve*, and *B. bifidum* are dominant in infants, while *B. longum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis* are common in adults (Arboleya et al., 2016).

Except for *Bifidobacterium dentium*, which is associated with dental caries, *Bifidobacterium* have not had any pathogenic potential to date. On the contrary, a number of health-promoting effects have been attributed to the presence of *Bifidobacterium* in GIT, including that irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and infectious diarrhea, modulation of the intestinal and systemic immune responses and colonization resistance of pathogens. (Westermann et al., 2016).

**Probiotics**

The word probiotic means “for life” in Greek, and also today it is defined by the World Health Organization and the Food and Agriculture Organization as living microorganisms that have positive effects on host health when consumed in sufficient quantities (Kechagia et al., 2013; Jungersen et al., 2014; Kumar et al., 2015; Panghal et al., 2018).

Probiotics play important roles with a variety of positive health effects, from producing beneficial ingredients to regulating microbial balance in the gut (Kwak et al., 2016).

One of the most important features of a probiotic strain is that being non-pathogenic and GRAS. In addition, for use as a probiotic should have some desirable properties such as low cost, the maintenance of viability during processing and storage, ease of application to products, resistance to physicochemical processes (Prado et al., 2008; Song et al., 2012). The probiotics used must be of human origin, must have been shown to have health effects in clinical studies, have been proven to be safe for food and clinical uses, must have antagonistic activity against pathogens, must be able to attach to the intestinal epithelial cells, be resistant to acid and bile salts, should be able to form antimicrobial compounds, compete with normal flora in the intestinal tract and stabilize intestinal microflora (Prado et al., 2008; Çelikel et al., 2018).

Probiotic bacteria have a positive effect on human health by improving the balance of intestinal microflora and improving mucosal defenses against pathogens. Additional health benefits include increased immune response, reduction of serum cholesterol, vitamin synthesis, anti-carcinogenic activity and anti-bacterial activity (Karimi et al., 2011).

One of the most important properties of bacteria to be used as probiotics is their ability to resist stressful conditions encountered during the passage through the gastrointestinal tract. In other words, it is important for the probiotic strains to be used to survive by crossing the intestinal tract and remain active in the colon for a sufficient period of time to display the probiotic function (Bunešová et al., 2015; Toscano et al., 2015).

Probiotics offer known health benefits, such as prevention and healing of bowel diseases. It has hypocholesterolemic, anticarcinogenic and antioxidative effects. Probiotics are also reported to help with atopic dermatitis, wound healing and have skin rejuvenating properties (Yakoob and Pradeep, 2019).

**Probiotic *Bifidobacterium* spp.**

*Bifidobacterium* are widely used as probiotics, that is, live microorganisms that provide a health benefit to the host when administered in sufficient quantities (Westermann et al., 2016). Probiotic strains of *Bifidobacterium* are used as starter cultures in many foodstuffs, especially fermented milk and dairy products. In various countries, there are more than 70 products such as vegetable juice, pickles, lemon oil, oat bran, soybeans and rice, which include probiotic *Bifidobacterium* strains like *B. longum*, *B. bifidum* etc. as a probiotic culture (Muş and Çetinkaya, 2018).

Among the various probiotic bacteria, *Bifidobacterium* is one of the most widely used and studied probiotic bacteria (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017). Out of the *Bifidobacterium* species identified to date, eight species currently used as probiotics; *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. thermophilum* and *B. adolescentis* (Sheu et al., 2010; Otieno, 2011). Specific bifidobacteri strains used as probiotics include *B. breve* Yakult strain, *B. breve* RO7O, *B. animalis* subsp. *lactis* BB12, *B. longum* RO23, *B. bifidum* RO71, *B. infantis* RO33, *B. longum* BB536, *B. longum* SBT-2928, *B. animalis* subsp. *lactis* HN019, *B. breve* BB99, *B. infantis* 35624, *B. bifidum* BGN4, *B. animalis* subsp. *lactis* AD011, *B. animalis* spp. *lactis* DN-173010, *B. animalis* subsp. *lactis* CNCM I-2494, *B. longum* 101, *B. bifidum* NCDO 1453, *B. bifidum* YIT4007, *B. longum*-88, *B. animalis* subsp. *lactis* UABLA-12, *B. breve* M-16V, *B. animalis* subsp. *lactis* NCC2828 strains can be shown (Otieno, 2011; Muş and Çetinkaya, 2018).

While *B. infantis* and *B. breve* species are most common in healthy babies (Vlasova et al., 2016), *B.* adolescentis and *B. longum* are reported as major *Bifidobacterium* species in the gastrointestinal tract of adult people (Delgado et al., 2008). *Bifidobacterium* species, which are most frequently isolated from infant feces, have been reported as *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* and *B. breve* (Narayanan and Subramonian, 2016). In

studies conducted, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* ssp. *longum* and *B. longum* spp. *infantis* strains are present in infants fed both breast milk and formula milk, however, *B. longum* ssp. *infantis* strain is mostly associated with breastfed infants. *B. longum* ssp. *longum* has been found more common among bottle-fed babies. It is found that *B. adolescentis*, which is common in adults, is present only in babies fed with formula (Arboleya et al., 2016). In addition, it has been reported that *B. breve* is the highest in nursing babies, and than *B. bifidum* and *B. longum* follow it respectively (Ku et al., 2016; Hidalgo-Cantabrana et al., 2017).

*Bifidobacterium* have been considered for a long time as probiotic, nutritious and therapeutic bacteria. Various health-promoting functions of *Bifidobacterium* have prepared it as an ideal dietary supplement (Awasti et al., 2016). *Bifidobacterium*, an important component of the intestinal microbiota, are generally produced as also commercial probiotics (Kwak et al., 2016).

*B. longum* BB536 is marketed in more than 30 countries worldwide as a milk-based beverage, yogurt, infant formula and functional food ingredient (Wong et al., 2019).

Probiotic *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 strain is the most documented probiotic *Bifidobacterium* in the world and has proven beneficial health effects in gastrointestinal health and immune function (Jungersen et al., 2014).

*B. longum* is a species of commensal bacteria in the human gastrointestinal tract (GIT), which is considered safe by the United States Food and Drug Administration and the European Food Safety Authority (Zhang et al., 2019).

*B. animalis* subsp. *lactis* is a probiotic bacteria that naturally lives in the intestines of most mammals, including humans (Kim et al., 2009).

*B. bifidum* S17 is a promising candidate probiotic strain that shows strong adhesion to intestinal epithelial cells and produces a strong anti-inflammatory effect (Wei et al., 2016).

The lack of phylogenetic relationship between the probiotic features of *Bifidobacterium* species is an indication that the ability of *Bifidobacterium* to show beneficial effects on human health is a strain-specific feature (Otieno, 2011; Presti et al., 2015).

**Health benefits and commercial use of probiotic *Bifidobacterium* spp.**

*Bifidobacterium* is important in gut microbiota studies and has long been used as a probiotic to alleviate various diseases by changing the gut microbiota composition (Azad et al., 2018). Evidence from human clinical trials and animal experiments show that consumption of *Bifidobacterium* can improve gut microbial balance, reduce intestinal transit time and reduce the risk and severity of diseases in the gastrointestinal tract (Meng, 2015).

*Bifidobacterium* offer beneficial effects on human health about reduction and treatment of diseases like cancer, inflammatory bowel disease, sensitive bowel syndrome, diarrhea caused by antibiotic use, lactose intolerance, atopy and allergic diseases. *Bifidobacterium* can also have antimicrobial effects on pathogenic bacteria and produce bioactive components such as some vitamins, essential fatty acids and exopolysaccharides (Russell et al., 2011; Muş and Çetinkaya, 2018).

*Bifidobacterium* contribute to the absorption of milk proteins by breaking down the α-casein in human milk with their phosphoprotein phosphatase activity. Thus, it provides improvement of protein metabolism. *Bifidobacterium* can produce vitamins B1, B2, B6, B12, also nicotinic acid and folic acid. *Bifidobacterium* improves kidney diseases and reduces blood ammonia levels by using ammonia as a nitrogen source or preventing the growth of ammonia and amine-producing bacteria. *Bifidobacterium* can stimulate the immune system with various immunological functions such as antitumor. *Bifidobacterium* act against lactose intolerance by digesting lactose with their enzyme β-galactosidase. Organic acids produced by *Bifidobacterium* have been reported to promote peristaltic movement of the intestine and aid normal bowel movement, thereby preventing diarrhea and constipation (Alp and Aslım, 2009). An important feature of *Bifidobacterium* as a probiotic bacterium is its ability to help prevent infections caused by pathogenic bacteria such as *E. coli*, *Salmonella* and *Helicobacter pylori* (Russell et al., 2011). In addition, *Bifidobacterium* can be produced bacteriocins which have antimicrobial effects against some bacteria such as *Micrococcus*, *Listeria*,

*Staphylacoccus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Enterecoccus*. Studies have shown that *Bifidobacterium* have antimutagenic and anticarcinogenic effects (Alp and Aslım, 2009). Many *Bifidobacterium* species have been found to reduce the incidence of tumors in the liver, colon, intestine and mammary gland of rats (Yakoob and Pradeep, 2019). However, studies have been limited with animal trials and human studies with definitive evidence have not been conducted (Russell et al., 2011). Probiotic *Bifidobacterium* is thought to play a role in lowering blood lipids and reducing the risk of heart disease (Alp and Aslım, 2009). High serum cholesterol level is associated with increasing the risk of cardiovascular disease. Although its mechanism is not fully known, *Bifidobacterium* have been reported to be use to reduce serum cholesterol levels (Russell et al., 2011).

*Bifidobacterium* are widely used as probiotics in the treatment and prevention of the disease of infants, with the contribution of their predominant presence in the infant intestine. Infants with gastrointestinal systems dominated by *Bifidobacterium* have shown very good results in the application of probiotic *Bifidobacterium* in pathologies such as allergy, celiac disease, obesity, diarrhea, colic, infections or necrotizing enterocolitis (Arboleya et al., 2016; Lewis et al., 2016).

Members of the genus *Bifidobacterium* make up the vast majority of the functional ingredients found in commercial probiotic food products at the present time (O'Callaghan and van Sinderen, 2016).

*B. lactis* HN019 is a well-defined probiotic strain with significant probiotic effects documented especially in the immune system field (Sanders, 2006).

*B. longum* subsp. *longum* W11 (LMG P-21586) is a probiotic strain isolated from the intestinal microbiota of a healthy human and known certain microbial properties (Inturri et al., 2017).

*B. longum* JDM301 is a commercial probiotic strain which used in many probiotic products sold in China (Wei et al., 2012).

Probiotic *B. bifidum* BGN4 and *B. animalis* subsp. *lactis* V9 strains are commercial Chinese *Bifidobacterium* with various probiotic functions (Sun et al., 2010).

Some *Bifidobacterium* strains, especially the *B. animalis* DN-173 010, which has been used for a long time in fermented milk products, shows high gastrointestinal survival capacity and shows probiotic properties in the colon. *Bifidobacterium* can prevent or alleviate infectious diarrhea with their effects on the immune system and the resistance of pathogens to colonization (Picard et al., 2005).

Acute diarrhea is the most studied disease in which *Bifidobacterium* are applied with great success, while *B. longum* and *B. breve* species are the most applied species against this disease (Di Gioia et al., 2014).

The study conducted in 2019 emphasize that, *Bifidobacterium* probiotics are a good choice for improving the mucosal immune system and they have positive effects of probiotics in the treatment of enteric parasitic infections (Al-Khaliq, 2019).

In a study conducted by Yiğin and Demirci in 2018, it has been reported that the probiotic-influenced *B. longum* strain affected the development of *Staphylococcus aureus* in vitro and can benefit antimicrobially against important pathogens today.

It is stated that, *B. longum* NCC 2705 strain has been reported to prevent mucus production and the combination of *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* reduces acute stress and depression (Azad et al., 2018).

In the study conducted to characterize the probiotic properties of two *Bifidobacterium* strains isolated from the feces of healthy Belarusian adults, it was reported that *B. animalis* strains have various beneficial properties and can be considered as probiotic cultures (Sidarenka et al., 2017).

It was reported that *B. animalis* subsp. *lactis* BF052 strain which isolated from healthy Thai babies fed with breast milk showed high survival against stressful conditions throughout the production process (Charnchai et al., 2017).

Pinto-Sanchez et al. (2017) reported that *B. longum* NCC3001 strain is a promising treatment tool for depression in patients with sensitive bowel syndrome.

Promising anti-inflammatory capacity of *B. bifidum* S17 strain which isolated from the feces of a breastfed baby and the exopolysaccharide production ability of *B. breve* UCC2003 are given as an example to the beneficial effects of probiotic *Bifidobacterium* species (Wei et al., 2016).

In the study conducted to identify and characterize the probiotic and functional properties of *Bifidobacterium* isolated from human resources by in vitro methods, three isolated strains were found to have significant probiotic and functional activities (Awasti et al., 2016).

*B. longum* subsp. *infantis* CECT7210 and *B.breve* K-110 strains have been reported to be successful in treating diarrhea with inhibition of rotavirus, the dominant cause of sporadic diarrhea in infants (O'Callaghan and van Sinderen, 2016).

Oral administration of *B. animalis* subsp. *lactis* PBSO75 strain which probiotic properties is determined with low pH and bile salt tolerances, antibiotic susceptibility, antimicrobial activity and B8, B9, B12 production capabilities, to patients with acute and chronic intestinal disorders was supported by in vivo experiments (Presti et al., 2015).

*B. breve* M-16 V, *B. longum* subsp. *infantis* M-63 and *B. longum* subsp. *longum* BB536 strains have been shown to protect intestinal health by improving the microbial surroundings of the intestines. It has also been reported that *B. breve* M-16 V strain can prevent necrotizing entrocolitis and infections in low birth weight infants (Toscano et al., 2015).

## CONCLUSION

*Bifidobacterium* spp. with the use alone or in combination with other probiotic bacteria and prebiotics, for clinical improvements are quite common todays. *Bifidobacterium*, which cover a large part of the gastrointestinal tract of humans and animals, have an important place in the commercial probiotic product market with their immune system regulators, serum cholesterol lowering and anti-carcinogenic effects, and further scientific research is becoming more important.

## REFERENCES

Al-Khaliq IMA 2019. Effect of *Bifidobacterium* Probiotic in the Treatment of Giardiasis Infection in Mice. Baghdad Science Journal, 16(4), 849-853.

Alp G. ve Aslım B 2009. İnsan bağırsak sisteminde probiyotik olarak bifidobakterilerin önemi. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, Cilt/Vol.:10-Sayı/No: 2: 343-354.

Anonymous, 2020. Web Sitesi: https://lpsn.dsmz.de/genus/*Bifidobacterium*, Erişim Tarihi: 15.02.2020.

Arboleya S, Watkins C, Stanton C and Ross RP 2016. Gut *Bifidobacterium* Populations in Human Health and Aging. Front. Microbiol. 7:1204. doi: 10.3389/fmic*B*.2016.01204.

Awasti N, Tomar SK, Pophaly SD, Lule VK, Singh TP, Anand S 2016. Probiotic and functional characterization of *Bifidobacterium* of Indian human origin. Journal of applied microbiology, 120(4), 1021-1032.

Azad M, Kalam A, Sarker M, Li T, Yin J 2018. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. BioMed research international, 2018.

Bunešová V, Vlková E, Geigerová M, Rada V 2015. Effect of rearing systems and diets composition on the survival of probiotic bifidobacteria in the digestive tract of calves. *Livestock Science*, *178*, 317-321.

Bunešová V, Vlková E, Rada V, Hovorkova P, Ročková Š, Kmeť V 2014. Direct identification of bifidobacteria from probiotic supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, *32*(2), 132-136.

Çelikel A, Göncü B, Akın MB, Akın MS 2018. Süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin canlılığını etkileyen faktörler. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, *8*(1/2), 59-68.

Charnchai P, Jantama SS, Jantama K 2017. Genome analysis of food-processing stressful-resistant probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BF052, and its potential application in fermented soymilk. FEMS microbiology letters, 364(17).

Delgado S, O'sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B 2008. In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal Bifidobacterium species and selection of new probiotic candidates. *Journal of applied microbiology*, *104*(4), 1119-1127.

Di Gioia D, Aloisio I, Mazzola G, Biavati B. 2014. *Bifidobacterium*: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. Applied microbiology and biotechnology, 98(2), 563-577.

Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. 2017. *Bifidobacterium* and Their Health-Promoting Effects. Microbiol Spectrum 5(3):BAD-0010-2016. doi:10.1128/microbiolspec .BAD-0010-2016.

Hussain SM, Naik M, Ahmed LA, Udipi M, Sukumaran SK 2020. Bioprocess development for enhanced production of probiotic Bifidobacterium bifidum. *Current Science (00113891)*, *118*(2).

Inturri R, Ventura M, Ruas-Madiedo P, Lugli GA, Blandino G 2017. Complete genome sequence of Bifidobacterium longum W11 (LMG P-21586), used as a probiotic strain. *Genome Announc.*, *5*(10), e01659-16.

Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D 2014. The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. *Microorganisms*, *2*(2), 92-110.

Karimi R, Mortazavian AM, da Cruz AG 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science & Technology*, *91*(3), 283-308.

Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN nutrition*, *2013*.

Kim JF, Jeong H, Yu DS, Choi SH, Hur CG, Park MS, ...Oh TK 2009. Genome sequence of the probiotic bacterium Bifidobacterium animalis subsp. lactis AD011. *Journal of bacteriology*, *191*(2), 678-679.

Ku S, Park MS, Ji GE, You HJ 2016. Review on *Bifidobacterium bifidum* bgn4: Functionality and nutraceutical applications as a probiotic microorganism. International journal of molecular sciences, 17(9), 1544.

Kumar BV, Vijayendra SVN, Reddy OVS 2015. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, *52*(10), 6112-6124.

Kwak MJ, Kwon SK, Yoon JK, Song JY, Seo JG, Chung MJ, Kim JF 2016. Evolutionary architecture of the infant-adapted group of Bifidobacterium species associated with the probiotic function. *Systematic and applied microbiology*, *39*(7), 429-439.

Lee JH, O'Sullivan DJ 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *74*(3), 378-416.

Lewis ZT, Shani G, Masarweh CF, Popovic M, Frese SA, Sela DA, ... Mills DA 2016. Validating *Bifidobacterium*l species and subspecies identity in commercial probiotic products. *Pediatric research*, *79*(3), 445-452.

Liong MT (Ed.) 2011. Probiotics: biology, genetics and health aspects (Vol. 21). Springer Science & Business Media.

Meng H 2015. The Role of The Probiotic *Bifidobacterium Animalis* Subsp. *Lactis* On Systemic Immune Function In Healthy Adults.

Muş TE, Çetinkaya F 2018. Probiyotik Olarak Bifidobakteriler. *Turkiye Klinikleri Food Sciences-Special Topics*, *4*(2), 21-27.

Narayanan R, Subramonian BS 2016. Probiotic activity of Bifidobacteria from infant faeces. *Indian Journal of Animal Research*, *50*(1), 63-68.

O'Callaghan A, van Sinderen D 2016. *Bifidobacterium* and their role as members of the human gut microbiota. Frontiers in microbiology, 7, 925.

Otieno DO 2011. Biology of prokaryotic probiotics. In *Probiotics* (pp. 1-28). Springer, Berlin, Heidelberg.

Panghal A, Janghu S, Virkar K, Gat Y, Kumar V, Chhikara N (2018). Potential non-dairy probiotic products–a healthy approach. *Food bioscience*, *21*, 80-89.

Papizadeh M, Rohani M, Nahrevanian H, Javadi A, Pourshafie MR 2017. Probiotic characters of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends. Microbial pathogenesis, 111, 118-131.

Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C 2005. bifidobacteria as probiotic agents–physiological effects and clinical benefits. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *22*(6), 495-512.

Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, ... Traynor J 2017. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology, 153(2), 448-459.

Prado FC, Parada JL, Pandey A, Soccol CR 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, *41*(2), 111-123.

Presti I, D'Orazio G, Labra M, La Ferla B, Mezzasalma V, Bizzaro G, ... Di Gennaro P 2015. Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. Applied microbiology and biotechnology, 99(13), 5613-5626.

Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*, *149*(1), 88-105.

Sanders ME 2006. Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. Journal of clinical gastroenterology, 40(9), 776-783.

Sheu SJ, Hwang WZ, Chiang YC, Lin WH, Chen HC, Tsen HY 2010. Use of tuf gene-based primers for the PCR detection of probiotic Bifidobacterium species and enumeration of Bifidobacteria in fermented milk by cultural and quantitative real-time PCR methods. *Journal of food science*, *75*(8), M521-M527.

Sidarenka A, Valentovich L, Novik G 2017. Evaluation of probiotic potential of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains: an in vitro study. The EuroBiotech Journal, 1(2), 182-183.

Song D, Ibrahim S, Hayek S 2012. Recent application of probiotics in food and agricultural science. In *Probiotics*. IntechOpen.

Sun Z, Chen X, Wang J, Gao P, Zhou Z, Ren Y, ... Zhang H 2010. Complete genome sequence of probiotic Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain V9. *Journal of bacteriology*, *192*(15), 4080-4081.

Tham CSC, Peh KK, Bhat R, Liong MT 2012. Probiotic properties of *Bifidobacterium* and *lactobacilli* isolated from local dairy products. *Annals of microbiology*, *62*(3), 1079-1087.

Toscano M, De Vecchi E, Gabrieli A, Zuccotti GV, Drago L 2015. Probiotic characteristics and in vitro compatibility of a combination of *Bifidobacterium breve* M-16 V, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* M-63 and *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536. *Annals of microbiology*, *65*(2), 1079-1086.

Turroni F, Duranti S, Bottacini F, Guglielmetti S, van Sinderen, D, Ventura M 2014. Bifidobacterium bifidum as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in microbiology*, *5*, 437.

Turroni F, van Sinderen D, Ventura M 2009. Bifidobacteria: from ecology to genomics. *Front Biosci*, *14*(4673), 84.

Ventura M, Turroni F, Lugli GA, van Sinderen D 2014. *Bifidobacterium* and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. Journal of the science of food and agriculture, 94(2), 163-168.

Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ 2016. Comparison of probiotic *lactobacilli* and *Bifidobacterium* effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. Veterinary immunology and immunopathology, 172, 72-84.

Wei X, Wang S, Zhao X, Wang X, Li H, Lin W, ... Sun Y 2016. Proteomic profiling of *Bifidobacterium bifidum* S17 cultivated under in vitro conditions. *Frontiers in microbiology*, *7*, 97.

Wei YX, Zhang ZY, Liu C, Malakar PK, Guo XK 2012. Safety assessment of Bifidobacterium longum JDM301 based on complete genome sequences. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *18*(5), 479.

Westermann C, Gleinser M, Corr SC, Riedel CU 2016. A critical evaluation of *Bifidobacterium*l adhesion to the host tissue. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1220.

Wong CB, Odamaki T, Xiao JZ 2019. Beneficial effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 on human health: Modulation of gut microbiome as the principal action. *Journal of functional foods*, *54*, 506-519.

Yakoob R, Pradeep BV 2019. *Bifidobacterium* sp as Probiotic Agent-Roles and Applications. J Pure Appl Microbiol, 13(3), 1407-1417.

Yiğin A, Demirci M 2018. Probiyotik Etkili *Bifidobacterium longum* ATCC 15707'nin, Staphylococcus aureus ATCC 29213'e İn-vitro Etkisinin Real-Time PCR Yöntemi ile İncelenmesi. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 7(2), 229-232.

Zhang C, Yu Z, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W 2019. Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*. Journal of functional foods, 53, 157-165.

Zhang G, Gao B, Adeolu M, Khadka B, Gupta RS 2016. Phylogenomic analyses and comparative studies on genomes of the Bifidobacteriales: identification of molecular signatures specific for the order Bifidobacteriales and its different subclades. *Frontiers in microbiology*, *7*, 978.

# İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri ve Virolojideki Kullanım Alanları

Eda Baldan Toker[1*], Gizem Alpay[1], Kadir Yeşilbağ[1]

[*1] Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: edabaldan@uludag.edu.tr

## Özet

Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, nükleik asit varlığının saptanması temeline dayanarak enfeksiyöz, genetik ve tümoral hastalıkların teşhisi yanı sıra adli tıp alanında da sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. En yaygın olarak kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodunda zorunlu olarak geniş laboratuvar donanımı ve sıcaklık döngü cihazı (thermalcycler) gerekmektedir. Oysa günümüzde thermalcycler cihazına ihtiyaç duymadan nükleik asitlerin izotermal koşullarda çoğaltılmasına olanak sağlayan yeni teknikler geliştirilmiştir. İzotermal amplifikasyon yöntemleri olarak tanımlanan bu teknikler arasında yer alan *transcription mediated amplification* (TMA), *self-sustained sequence replication* (3SR), *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA), *strand displacement amplification* (SDA), *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), *recombinase polimerase amplification* (RPA) ve *helicase-dependent amplification* (HDA) gibi yöntemler viroloji alanındaki çalışmalarda en yaygın kullanılan yöntemlerdendir. Söz konusu amplifikasyon yöntemleri DNA virüslerinin amplifikasyonu için kullanıldığı gibi reaksiyonun ilk basamağında uygulanan reverz transkripsiyon işlemi sonrasında RNA virüslerinin amplifikasyonunda da başarıyla çalışılmaktadır. Bu derleme makalesinde, söz konusu izotermal nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin çalışma prensipleri açıklanmış ve virolojik araştırmalardaki uygulama alanlarına örnekler verilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, PCR metoduna kıyasla izotermal amplifikasyon yöntemleri hızlı, uygun maliyetli ve kolay uygulanabilir olması sebebiyle insan ve hayvanların viral kaynaklı enfeksiyonlarının güvenilir bir şekilde teşhis edilmesine katkı sağlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** İzotermal amplifikasyon yöntemleri, LAMP, NASBA, RPA, SDA, TMA, 3SR, HDA, PCR, Virüs

# Isothermal Amplification Methods and It's Application in Virology

## Abstract

Nucleic acid amplification methods are frequently used in the forensic medicine and diagnosis of infectious, genetic and tumoral diseases. One of these methods, polymerase chain reaction (PCR) which is the most widely used nucleic acid amplification method, is required extensive laboratory equipment and a thermalcycler. Nowadays, new techniques have been developed that allow the amplification of nucleic acid under isothermal conditions without the need for a thermalcycler. Isothermal amplification methods including transcription mediated amplification (TMA), self-sustained sequence replication (3SR), nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), strand displacement amplification (SDA), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), recombinase polimerase amplification (RPA) and helicase-dependent amplification (HDA) are among the most widely used methods in the field of virology. These amplification methods are used for the amplification of DNA viruses as well as the amplification of RNA viruses following the reverse transcription. In this review article, it is aimed to explain the principles of these isothermal nucleic acid amplification methods by examples from the field of virological research. Consequently, isothermal amplification methods contribute to the reliable diagnosis of viral infections of humans and animals as it is fast, cost-effective and easy to apply compared to the PCR method.

**Keywords:** Isothermal amplification methods, LAMP, NASBA, RPA, SDA, TMA, 3SR, HDA, PCR, Virus

## GİRİŞ

Virüslerin tespitine yönelik tanı yöntemleri arasındaki serolojik yöntemler, hücre kültüründe virüs izolasyonu ve nükleik asit tespit yöntemleri ön sıralarda yer almaktadır. Materyal olarak kan serumunun kullanıldığı serolojik yöntemler, enfekte hayvanın enfeksiyon geçmişini ortaya çıkarabilir, ancak bu yöntemler düşük hassasiyet ve yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkması gibi sorunları barındırmaktadır. Virüslerin hücre kültüründe izolasyonu aracılığıyla tespit edilmesi genellikle kesin sonuçlar vermektedir. Ancak virüs izolasyonu çalışmasının uzun süre gerektirmesi ve virüs izolasyonu sonuçlarının negatif olması test edilen

virüsün yokluğu anlamına gelmemektedir. Bu geleneksel yöntemlerin eksiklikleri sonuçların gecikmesine veya yanlış yorumlanmasına neden olabilmektedir (Lau ve ark., 2006).
Nükleik asit tespit yöntemleri biyoteknolojideki yenilikler sayesinde hastalıkların tanısı için yaygın olarak kullanılan laboratuvar teknikleri arasına girmiştir. Günümüzde nükleik asit amplifikasyon yöntemleri araştırma, tıp, adli tıp ve tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan amplifikasyon yöntemi ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) adı verilen hedef amplifikasyon metodudur (Gill ve Ghaemi, 2008). İlk olarak 1983 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanan bu teknik, hücre içinde gerçekleşen doğal replikasyonun bir tüp içinde taklit edilmesi esasına dayanmaktadır (Tarhan, 2002). PCR karışımının sıcaklığını yükseltmek ve düşürmek suretiyle, DNA ürününün iki iplikçiği ayrılarak bir sonraki bağlanma (annealing) ve uzama (extension) turu için şablon görevi görmektedir (Gill ve Ghaemi, 2008). Üç değişik sıcaklıkta gerçekleşen bu reaksiyonun bir döngü halinde tekrarlanması sonucunda başlangıçtaki birkaç molekül hedef DNA kopyasından çok yüksek miktarda DNA ürünü elde edilir. Bu amaçla "thermalcycler" adı verilen sıcaklık döngü cihazı kullanılır (Tarhan, 2002). Bu işlemlerde kullanılan cihaz ve sistemler pahalı ve özel donanımlar gerektirmektedir. Buna karşın son 20 yılda thermalcycler cihazı gerektirmeyen izotermal amplifikasyon teknikleri geliştirilmiştir. PCR tabanlı olmayan bu yöntemler, DNA/RNA sentezinin moleküler biyolojisindeki bazı yeni bulgulara ve bazı yardımcı proteinlerin nükleik asit amplifikasyonu için in-vitro olarak taklit edilmesine dayanmaktadır. İzotermal amplifikasyon yöntemlerinden bazıları şunlardır: *Transcription mediated amplification* (TMA), *Self-sustained sequence replication* (3SR), *Nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA), *Strand displacement amplification* (SDA), *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), *Recombinase polimerase amplification* (RPA) and *Helicase-dependent amplification* (HDA).

## A. İZOTERMAL AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ

### 1. Transcription mediated amplification (TMA)/ Self-sustained sequence replication (3SR)

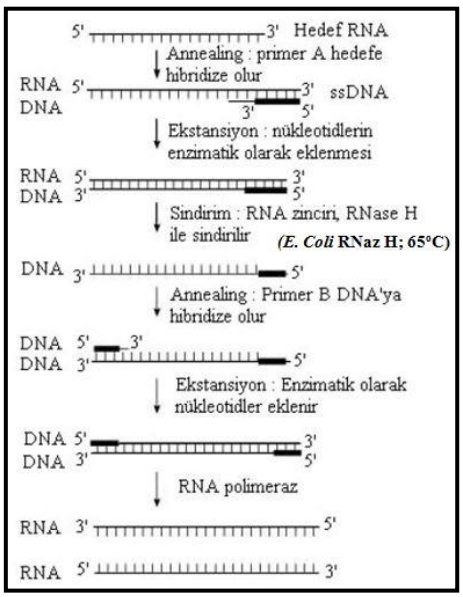
TMA yöntemi, ilk kez 1989 yılında Kwoh ve arkadaşları tarafından tanımlanmış bir yöntemdir. Temel olarak insan immun yetmezlik virüsü (HIV-1) RNA'sında *vif* (viral infectivity factor) genlerini saptamak amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntemde hedef olarak RNA veya denatüre edilen DNA zinciri ile birlikte bir ucunda hedefe spesifik sekanslar diğer ucunda ise polimeraz bağlanma bölgesi bulunan primerler kullanılır. Primerlerin 5' ucunda yer alan polimeraz bağlanma bölgeleri T7, T3 ya da SP6 RNA fajlarının polimeraz enzimlerinin promotör bölgelerini içeren dizinlerden oluşmuştur (Froussard, 1993).

TMA yönteminin ilk basamağında hedef RNA'nın reverz transkriptaz (RT) enzimi ile DNA kopyası (cDNA) çıkarılır aynı zamanda reverz transkriptazın RNaz-H aktivitesi ile 95°C'de RNA dizini sindirilir. İkinci basamakta ise sentezlenen bu cDNA kalıp olarak kullanılarak in-vitro transkripsiyon amaçlanır. Reaksiyona yeniden reverz transkriptaz enzimi eklenir ve ikinci iplikçiğin oluşması sağlanır. Böylece çift iplikçikli DNA (dsDNA) oluşur. Daha çok dsDNA üretmek için daha çok reverz transkriptaz eklenmesi gerekmektedir. Ayrıca reaksiyona eklenen RNA polimeraz enzimi aracılığıyla çoklu RNA kopyalarının çıkarılması sağlanır. Çoğaltılmış RNA dizileri çeşitli hibridizasyon yöntemleri ile saptanabilir (Özerol, 1997). Bu amaçla akridinyum ester ile işaretli DNA probları kullanılabilir (Tarhan, 2002).

TMA yönteminde ortaya çıkan RNA-DNA dupleksinin denatürasyonu sıcaklık aracılığıyla olduğu için, normal koşullarda her yeni döngüde yüksek sıcaklık derecelerine dayanıksız enzimlerin yeniden eklenmesi gerekmektedir (Kwoh ve ark., 1989). TMA'nın modifiye edilerek RNA-DNA dupleksini ayırmak için *Escherichia coli* RNaz H enziminin kullanılması ile bu sorun ortadan kaldırılmıştır. 1991 yılında bu modifikasyon tekniğini geliştiren Jean Compton, geliştirdiği teknolojiye "*Nucleic acid sequence-based amplification* (*NASBA*)"; Thomas R. Gingeras ve arkadaşları ise "*Self-sustained sequence replication* (3SR)" adını vermiştir (Compton, 1991; Gingeras ve ark., 1991). Her iki yöntem de birçok açıdan retroviral RNA replikasyonuna benzemektedir. TMA'dan farklı olarak 3SR yöntemi siklus olarak uygulanmaz ve çok hızlıdır; ancak duyarlılığı PCR'dan düşüktür. Reaksiyon izotermal koşullarda gerçekleşir ve hedef RNA, *Escherichia coli* RNaz H enzimi ile 65°C'de sindirilir **(Şekil 1)**. Reaksiyon başında denatürasyon işlemi uygulanarak DNA amplifikasyonu yapılabilir (Özerol, 1997).

3SR tekniğinde 15 dakika içinde siklus gerektirmeden $10^5$ kopya çoğaltılmakta, 30 dakikada ise hedef nükleik asit $10^8$ kez çoğaltılabilmektedir (Froussard, 1993). Tekniğin dezavantajı ise tüm amplifikasyon yöntemlerinde olduğu gibi kontaminasyondan etkilenmesidir. Ayrıca reaktanların diğer amplifikasyon yöntemlerine kıyasla daha az olması sebebiyle yöntemin spesifitesi düşüktür. Bunun nedeni enzimlerin yüksek sıcaklıklara

dayanıksız olmasıdır. Termostabil RNA polimeraz ve reverz transkriptaz enzimi kullanılması durumunda 3SR yöntemi PCR'dan daha üstün hale gelebilir (Özerol, 1997).



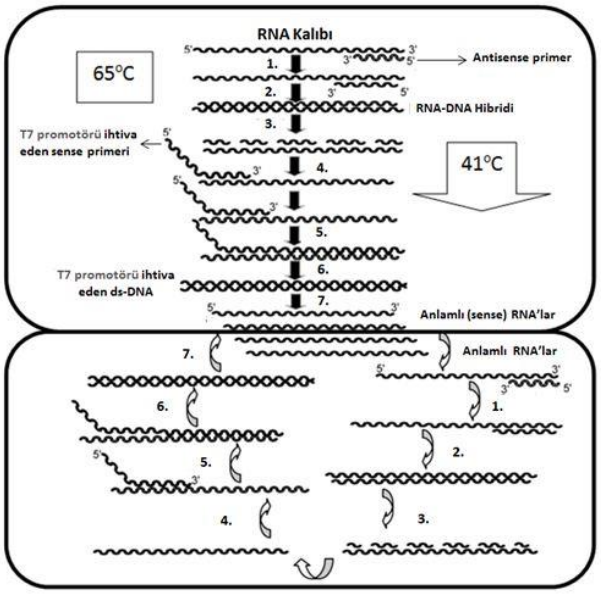

**Şekil 1.** 3SR mekanizmasının ilk siklusunun şematik gösterimi (Özerol, 1997).

## 2. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)

1991 yılında geliştirilen NASBA, PCR'a alternatif olarak kullanılabilen, enzim temelli, izotermal ve RNA tabanlı bir amplifikasyon tekniğidir (Compton, 1991). NASBA'da, reverz transkritaz, RNaz-H ve RNA polimeraz enzimlerinin karışımı ve hedefe spesifik iki adet primer kullanılmaktadır (Lau ve ark., 2006). Hedef RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi sırasında kullanılan primerlerin bir ucu hedefe spesifik sekanslar içerirken, diğer ucu T7 fajı RNA polimerazı için promotör görevi yapar (Tarhan, 2002). Tekniğin basamakları **Şekil 2**'de şematize edilmiştir. Özetle;

- Basamak 1, antisense primer RNA kalıbının 3'ucunu hedef alır ve spesifik sekansa bağlanır.
- Basamak 2, reverz transkriptaz (RNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi) aracılığıyla erken RNA zincirine tamamlayıcı olan cDNA uzatılır (RNA-DNA hibriti).
- Basamak 3, RNA-DNA hibriti RNaz H ile muamele edilir ve erken RNA dejenere olur.
- Basamak 4, T7 promotörü ihtiva eden sense primeri, yeni sentezlenen ss-DNA'nın spesifik bölgesine bağlanır.
- Basamak 5, cDNA sarmalı reverz transkriptaz (DNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi) aracılığıyla uzatılır.
- Basamak 6, kendi kendine devam edebilir (self-sustained) yapıda işlev gören T7 promotörü ile bir ds-DNA oluşturulur.
- Basamak 7, ds-DNA'yı kalıp olarak kullanarak T7 RNA polimeraz, anlamlı (sense) RNA'ları sentezler.
- Daha sonra sentezlenen RNA'ların her biri bu işlem basamaklarına tekrar katılabilir ve daha fazla RNA amplikonu biriktirilir (Gill ve Ghaemi, 2008).

Optimum koşullar altında, 90 dakikada PCR metoduyla $10^9$ kata kadar amplifikasyon gerçekleşirken, NASBA tekniğinde $10^{12}$ kat amplikon elde etmek mümkündür. Bu durum, diğer amplifikasyon yöntemleriyle kıyaslandığında NASBA tekniğinin öne çıkmasına neden olmaktadır (Lau ve ark., 2006). NASBA'nın son ürünleri, jel elektroforezi, floresan probları (real time NASBA) ve kolorimetrik test (NASBA ELISA) kullanılarak saptanabilir (Gill ve Ghaemi, 2008).

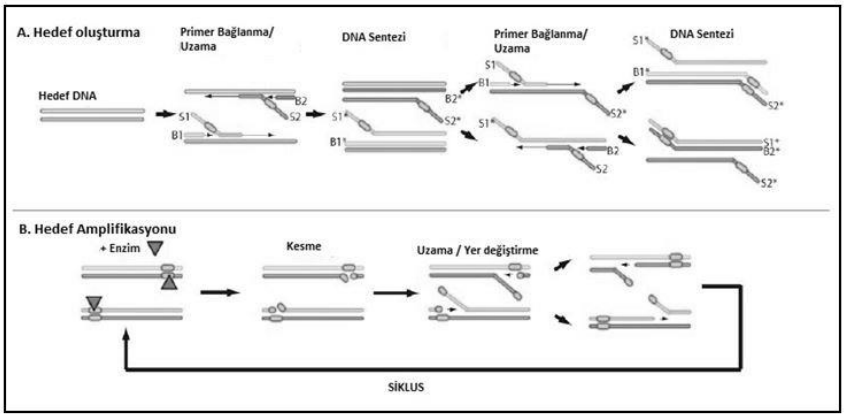



**Şekil 2.** NASBA mekanizmasının şematik gösterimi (Gill ve Ghaemi, 2008).

## 3. Strand displacement amplification (SDA)

SDA, hedef nükleik asitin çoğaltılması için spesifik primerler, DNA polimeraz ve restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılan izotermal bir DNA amplifikasyon yöntemidir (Özerol, 1997; Walker ve ark., 1992). SDA yönteminin temeli restriksiyon endonükleazlar (Hinc II, Hind II, Ava Nci I, Fnu 4HI vd) ile spesifik bölgelerin kesilmesi esasına dayanır. Testte kullanılan primerlerin 5' uçlarında yaklaşık 20 nükleotidlik bir DNA dizini ve bunu izleyen uygun bir restriksiyon enzimi bölgesi yer alırken, 3' ucuna yakın bölgede ise hedef DNA'ya komplementer bir nükleotid dizini bulunur. Testin ilk aşamasında, orijinal hedef dizini amplifikasyon döngüsü için hazırlayan bir başlangıç reaksiyonu gerekmektedir (**Şekil 3A**). Bunun için ilk olarak hedef DNA, 95°C'de denatüre edilir. Takiben dört adet primer (B1, B2, S1 ve S2), hedef iplikçiklerde çoğaltılacak spesifik bölgeye bağlanır. Primerlerin eklenmesinden sonra reaksiyon karışımı 37°C'ye soğutulur. Reaksiyona DNA polimeraz Klenow fragmanı (polimeraz aktivitesi +; nükleaz aktivitesi -) ve restriksiyon enzimi ile birlikte alfa-thio dNTP'ler eklenerek 4 primer aynı anda uzamaya başlar. Normal koşullarda, restriksiyon enzimlerinin kesilmiş ürünleri çift iplikçikli DNA'dır ve bunlar SDA için uygun ürünler değildir. Burada kullanılan alfa-thio dNTP'lerin standart dNTP'ler gibi endonükleazlarla kesilememesi sebebiyle tek bir iplikçik kesilmiş olur. Ayrıca primer S1 ve S2'in 5' uçlarında restriksiyon enzimini tanıyan baz dizini (GTTGAC) bulunmaktadır. Böylece S1 ve S2 primerlerinin uzaması esnasında 5' ucunda restriksiyon enzimini tanıma bölgesini içeren komplementer DNA iplikçiği oluşur. Primer B1 ve B2 ise primer S1 ve S2 tarafından yeni sentezlenen iplikçiği uzaklaştırır ve aynı iplikçiği tekrar kullanıma hazırlar. Başlangıçta S2 primeriyle uzatılıp ayrılan yeni iplikçiğe primer S1 ve B1 bağlanırken, S1 primeriyle uzatılıp ayrılan iplikçiğe primer S2 ve B2 bağlanır. Böylece ortaya çıkan uzama ve uzaklaştırma reaksiyonları sonunda uçlarında restriksiyon enzimini tanıma bölgesi içeren dizinler sentezlenir ve bu kopyalar SDA reaksiyonunun ikinci kısmına girer. Amplifikasyonun ilk aşama olan hedef dizin oluşturma basamaklarının sonunda çift iplikçikli, belirli uzunlukta, her iki ipliçiğinin ucunda restriksiyon enzimini tanıma bölgesi içeren ve kesilmeye yatkın iplikçikler meydana gelmektedir (**Şekil 3B**) (Özerol, 1997; Walker ve ark., 1992).

SDA yönteminde denatürasyon aşaması dışında, bütün tepkime 37°C'de yürütülür ve primer bağlanması, kesilme, zincir ayrılması ve DNA sentezi aşamalarında özgül bir bölge PCR yönteminde olduğu gibi geometrik olarak çoğaltılır (Tarhan, 2002). İki saatlik bir sürede hedefi $10^7$ kata kadar çoğalttığı bildirilmiştir (Walker ve ark., 1992).




**Şekil 3.** SDA mekanizmasının şematik gösterimi.

A: SDA için hedef oluşturma şeması. B: SDA reaksiyon siklusu (Troger ve ark., 2015).

## 4. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

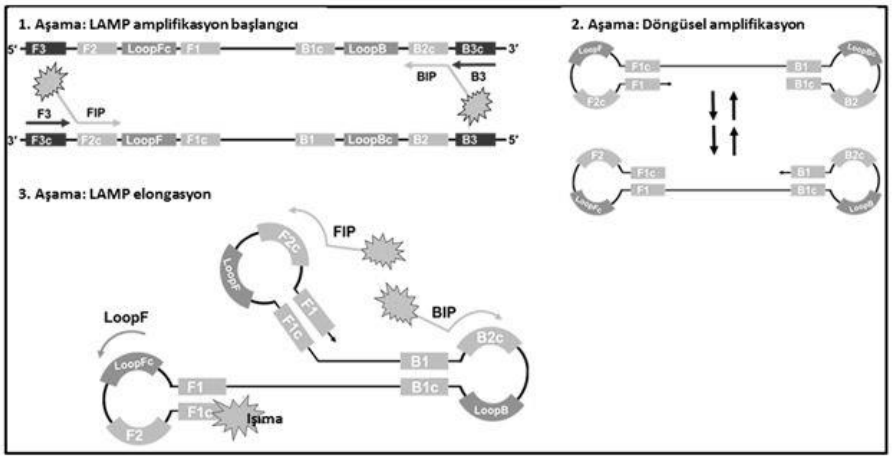
Loop-mediated isothermal amplifikasyon (LAMP) yönteminde reaksiyon, hedef bölgeye özgü 2 adet forward ve 2 adet reverz primer kullanılarak izotermal şartlarda (60-65°C) gerçekleştirilir. Kullanılan enzim *Bacillus stearothermophilus*'tan elde edilen ve zincir yer değiştirme (strand displacement) özelliği olan fakat ekzonükleaz aktivitesi olmayan "*Bst DNA polimeraz*" enzimidir. Gerçekleştirilen modifikasyon çalışmalarında bu primerlere ilave olarak 2 adet döngü (loop) primeri kullanıldığında reaksiyon süresinin kısaldığı ve hassasiyetinin arttığı bildirilmiştir (Nagamine ve ark., 2002). Bu şekilde kullanıldığında toplam 6 adet primer hedef DNA'da 8 spesifik bölgeye bağlanmakta ve reaksiyonun spesifitesi artmaktadır. Ayrıca aynı reaksiyon tüpüne reverz transkriptaz enzimi eklenerek yöntem RNA amplifikasyonu için de kullanılabilmektedir (Mori ve Notomi, 2009).

LAMP reaksiyonu üç aşamadan oluşan bir reaksiyondur. Tüm aşamalar tek bir sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Birinci aşama, 65°C'de dinamik dengede olan çift iplikçikli DNA'nın denatürasyonuna gerek duyulmadan primerlerden birinin bağlanmasıyla başlamaktadır (Nagamine ve ark., 2002). Forward Inner Primeri (FIP) F1c ve F2 olarak adlandırılan, Backward Inner Primeri (BIP) ise B1c ve B2 olmak üzere ikişer birime sahiptir. FIP'nin F2 birimi, dizinin 5' ucunda yer alan ve tamamlayıcı bölgesi olan F2c'ye bağlanarak yeni zincirin 3' ucuna doğru sentezlenmesini sağlar. Aynı anda inner (iç) primerden birkaç baz kısa ve düşük konsantrasyonda olan Forward Outer Primer (F3) hedef bölgesine daha yavaş bir şekilde bağlanır. Bu şekilde yeni bir zincir sentezlenmeye başlar. Bst DNA polimerazın zincir yer değiştirme özelliği olduğundan yeni zincir sentezlenirken mevcut çift iplikçikli zincir tek iplikçikli hale getirilmiş olur. Bu tek iplikçikli zincir kalıp olarak kullanılarak aynı işlem 3' ucunda Backward Inner Primer (BIP) ve Backward Outer Primer (B3) tarafından gerçekleştirilerek döngüsel amplifikasyon için başlangıç materyali oluşur. İkinci aşama olan döngüsel amplifikasyon aşaması, dizinin 5'ucundaki FIP'nin F1c birimi ile aynı dizin üzerinde bulunan F1 bölgesinin bağlanması ile başlar. Takip eden basamaklarda 3'ucunda BIP'in B1c birimi de yine aynı dizin üzerindeki B1 bölgesine bağlanır. Böylece LAMP'ın "Dumbıl" olarak adlandırılan ara ürün yapısı oluşmaktadır. Bu aşama başlangıç ürünü ve bu ürünün ters tekrarlarının internal primerlerle logaritmik ve devamlı olarak çoğaltılmasına olanak vermektedir. Üçüncü aşama olan uzama (elongasyon) aşamasında, bu döngü esnasında oluşan ara ürünler kullanılır ve bu ara ürünlere FIP ve BIP'lerin bağlanmasıyla uzama başlar. Bunu takiben ilgili primerlerin tek iplikçikli ilmek bölgesine bağlanmasıyla yeni zincirler sentezlenirken mevcut çift iplikçikli zincirler açılarak reaksiyonun devamını sağlar. LAMP reaksiyonu sonunda, farklı büyüklüklere sahip ilmek DNA bölgesi, hedef DNA bölgesi ve bunların çok sayıda ters tekrarlarını içeren ürünler meydana gelmektedir (Tezel ve ark., 2010).

LAMP yönteminin ana mekanizması Şekil 5'de şematize edilmiştir (Sakurai ve Shibasaki, 2012). Ancak LAMP döngüsünün animasyon görüntüsünün incelenmesi reaksiyon prensibinin daha açık bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

LAMP reaksiyonunda bazı ek loop primerleri kullanılarak tekniğin etkinliği artırılabilir ve reaksiyon süresinin ortalama 30 dakikada tamamlanabileceği gösterilmiştir. Buradaki temel prensip kullanılan primerlerin her birinin DNA sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapmasıdır (Nagamine ve ark., 2002).

Reaksiyon sonunda oluşan ürünün belirlenmesi ve doğrulanması başlıca 4 yöntemle yapılabilmektedir. Bunlar; bulanıklığın yada floresan ışımanın görsel olarak belirlenmesi, bulanıklığın gerçek zamanlı belirlenmesi, agaroz jel analizi ve ürünün sekans spesifik olarak belirlenmesi (Tezel ve ark., 2010).

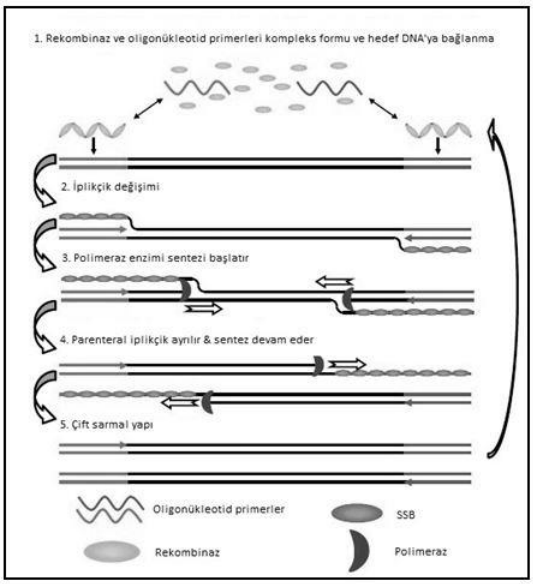



**Şekil 4.** LAMP mekanizmasının şematik gösterimi (Hardinge ve Murray, 2019).

## 5. Rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (*RPA*)

RPA, laboratuvar donanımını basitleştirmek amacıyla PCR'a alternatif olarak geliştirilmiş izotermal nükleik asit amplifikasyon tekniklerinden birisidir. Tüm reaksiyon tek tüp içerisinde gerçekleşir ve thermalcycler cihazına ihtiyaç duyulmamaktadır. Optimum çalışma sıcaklığı 37–42 °C arasındadır. Reaksiyon rekombinaz ve polimeraz olmak üzere iki enzimle çalışmaktadır. Rekombinaz, DNA'daki homolog sekanslar ile oligonükleotid primerlerini eşleştirmede görev alırken; polimeraz primerin hedef DNA'ya bağlandığı yerde DNA sentezini başlatır. Reaksiyona eklenen ss-DNA binding protein (SSB) ise DNA dizilerine bağlanır ve primerlerin yer değişmesini önler. RPA'da iki adet primer kullanılarak hedef DNA'nın amplifikasyonu başlatılır (**Şekil 5**). Optimal sıcaklık değerleri uygulandığında birkaç hedef noktadan başlayan ve 10 dakika içinde tespit edilebilir seviyelere ulaşan spesifik DNA amplifikasyonu elde edilebilir (Zanoli ve Spoto, 2013).

Amplifikasyon prosedürüne, temel olarak kullanılan RPA enzimleri dışında ekzonükleaz III ve reverz transkriptaz (RT) gibi enzimler de eklenebilmektedir. Ekzonükleaz III enzimi eklenmesi real-time PCR'a benzer şekilde gerçek zamanlı bir floresan algılama için ekso probu kullanılmasına izin vermektedir. Reaksiyona RNA ürünlerinin tespiti amacıyla 37-42 °C'de çalışabilen bir reverz transkriptaz enzimi eklenmesi sonucunda elde edilen cDNA aracılığıyla RNA'nın tek tüp içerisinde ve tek adımda çoğaltılmasına olanak sağlanmaktadır (Boyle ve ark., 2014; Piepenburg ve ark., 2006).

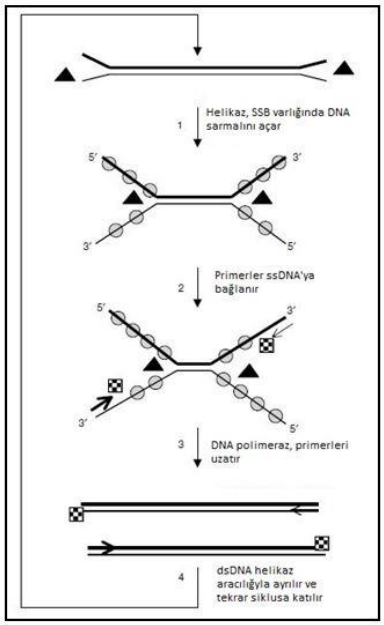



**Şekil 5.** RPA mekanizmasının şematik gösterimi (Boyle ve ark., 2014).

### 6. Helicase-dependent amplification (HDA)

HDA yöntemi, DNA'nın çift sarmallı yapısının denatürasyonu için yüksek sıcaklık dereceleri yerine helikaz kullanılması temeline dayanır. Spesifik primerler tek iplikçikli kalıp haline dönüşen DNA dizinine bağlanır ve hedef dizin DNA polimeraz ile uzatılır. Bu işlem, tek bir inkübasyon sıcaklığında amplifikasyonun devam etmesine izin verir; böylece thermalcycler ihtiyacını tamamen ortadan kaldırır. HDA amplikonları, jel elektroforezi, real-time format ve ELISA kullanılarak tespit edilebilir (Gill ve Ghaemi, 2008; Vincent ve ark., 2004). İşlem basamakları **Şekil 6**'da şematize edilmiştir (Vincent ve ark., 2004). Özetle;

- Basamak 1, helikaz (siyah üçgen), SSB (gri daire) aracılığıyla birbirine bağlı olan DNA iplikçiklerini birbirinden ayırır.
- Basamak 2, primerler (siyah oklar) ssDNA şablonu üzerindeki hedef bölgeye bağlanır.
- Basamak 3, DNA polimeraz (mozaik desenli kareler), şablon DNA üzerinde hibridize olan primerleri uzatır.
- Basamak 4, uzayan ürünler bir sonraki amplifikasyon siklusuna girerler.




**Şekil 6.** HDA mekanizmasının şematik gösterimi (Vincent ve ark., 2004).

## B. İZOTERMAL AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİNİN VİROLOJİDEKİ KULLANIM ALANLARI

İzotermal amplifikasyon yöntemleri kullanılarak bakteriyel, viral, fungal ve protozoal birçok enfeksiyöz etkenin tanısı güvenli bir şekilde yapılabilmektedir (Tarhan, 2002). Günümüzde izotermal amplifikasyon yöntemleriyle tespit edilebilen viral enfeksiyonların bir bölümü Tablo 1'de sunulmuştur (Coertse ve ark., 2019; Grabarczyk ve ark., 2013; Höfler ve ark., 1995; Kim ve ark., 2011; Lu ve ark., 2017; Tüney ve ark., 2017). İzotermal amplifikasyon yöntemleri arasında en yaygın kullanım alanı bulan yöntem ise LAMP tekniğidir. Bu teknik insanlarla birlikte birçok hayvan türünde de viral enfeksiyonların hızlı tanısında kullanılmaktadır (Tablo 2) (Estrela ve ark., 2019; Li ve ark., 2010; Mukhopadhyay ve ark., 2012; Okuwa ve ark., 2017; Park ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Wheeler ve ark., 2016).

**Tablo 1.** Bazı izotermal amplifikasyon yöntemleri ile saptanan viral etkenler

| Yöntem | Hastalık etkeni | Aile-Cins |
|---|---|---|
| **TMA** | Hepatitis C virüsü | *Flaviviridae-Hepacivirus* |
| | Hepatitis B virüsü | *Flaviviridae-Hepacivirus* |
| | Hepatitis E virüsü | *Flaviviridae-Hepacivirus* |
| | Dengue virüsü | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | Batı Nil humması virüsü | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | Zika virüsü | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | İnsan immun yetmezlik virüsü | *Retroviridae-Lentivirus* |
| | Herpes simplex virüsü | *Herpesviridae-Simplexvirus* |
| | İnsan papillomavirüs | *Papillomaviridae-Alphapapillomavirus* |
| **3SR** | Kızamık virüsü | *Paramyxoviridae-Morbillivirus* |
| | İnsan immun yetmezlik virüsü (HIV) | *Retroviridae-Lentivirus* |
| **NASBA** | Dengue virüsü | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | Batı Nil humması virüsü | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | Hepatitis A virüsü | *Flaviviridae-Hepacivirus* |
| | Classic swine fever virüsü | *Flaviviridae-Pestivirus* |
| | Şap hastalığı virüsü | *Picornaviridae-Aphtovirus* |
| | İnsan immun yetmezlik virüsü | *Retroviridae-Lentivirus* |
| | Kedilerin immun yetmezlik virüsü | *Retroviridae-Lentivirus* |
| | Kuduz virüsü | *Rhabdoviridae-Lyssavirus* |
| | Batı at ensefalitisi virüsü | *Togoviridae-Alphavirus* |
| | Newcastle hastalığı virüsü | *Paramyxoviridae-Avulavirus* |
| | Avian influenza virüsü | *Orthomyxoviridae-Alphainfluenzavirus* |
| | İnsan papillomavirüs | *Papillomaviridae-Alphapapillomavirus* |
| **SDA** | İnsan cytomegalovirüs | *Herpesviridae-Cytomegalovirus* |
| | İnsan papillomavirüs | *Papillomaviridae-Alphapapillomavirus* |
| | İnsan immun yetmezlik virüsü (HIV) | *Retroviridae-Lentivirus* |
| **RPA** | Rift Vadisi humması virüsü | *Phenuiviridae-Phlebovirus* |
| | Şap hastalığı virüsü | *Picornaviridae-Aphtovirus* |
| | Lumpy skin disease virüsü | *Poxviridae-Capripoxvirus* |
| | Ektima (Orf) virüsü | *Poxviridae-Parapoxvirus* |
| | Sığır coronavirüsü | *Coronaviridae-Betacoronavirus* |
| | Kuduz virüsü | *Rhabdoviridae-Lyssavirus* |
| | Köpek parvovirüs-2 | *Parvoviridae-Bocaparvovirus*) |
| | Domuz circovirüs-2 | *Circoviridae-Circovirus* |
| | Avian influenza virüsü | *Orthomyxoviridae-Alphainfluenzavirus* |
| **HDA** | Herpes simplex virüs-1 ve 2 | *Herpesviridae-Simplexvirus* |
| | İnsan immun yetmezlik virüsü | *Retroviridae-Lentivirus* |
| | İnsan papillomavirüs | *Papillomaviridae-Alphapapillomavirus* |

**Tablo II.** LAMP tekniğinin veteriner virolojideki kullanım alanları

| Canlı Türü | Hastalık | Aile-Cins |
|---|---|---|
| **İnsan** | Zika virüs enfeksiyonu | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | Dengue virüs enfeksiyonu | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | Hepatitis C virüs enfeksiyonu | *Flaviviridae-Hepacivirus* |
| | Cytomegolavirüs enfeksiyonu | *Herpesviridae-Cytomegalovirus* |
| | İnsan influenza A virüs enfeksiyonu | *Orthomyxoviridae-Alphainfluenzavirus* |
| | Ektima (Orf) | *Poxviridae-Parapoxvirus* |
| | Lassa virüs enfeksiyonu | *Arenaviridae-Mammarenavirus* |
| **Geviş getiren hayvanlar** | Şap hastalığı | *Picornaviridae-Aphtovirus* |
| | Bovine viral diarrhea | *Flaviviridae-Pestivirus* |
| | Rift vadisi humması | *Phenuiviridae-Phlebovirus* |
| | Lumpy skin disease | *Poxviridae-Capripoxvirus* |
| | İnfeksiyöz bovine rhinotrakeitis | *Herpesviridae-Alphaherpesvirus* |
| | Sığır löykozu | *Retroviridae-Deltaretrovirus* |
| | Mavidil | *Reoviridae-Orbivirus* |
| | Küçük ruminant vebası | *Paramyxoviridae-Morbillivirus* |
| | Koyun ve keçi çiçeği | *Poxviridae-Capripoxvirus* |
| | Ektima (Orf) | *Poxviridae-Parapoxvirus* |
| **Domuz** | Domuz parvovirüs enfeksiyonu | *Parvoviridae-Protoparvovirus* |
| | Domuz reproduktif ve respiratorik sendrom | *Arteriviridae-Porarterivirus* |
| | Japanese encephalitisi | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | Domuz torovirüs enfeksiyonu | *Tobaniviridae-Torovirus* |
| | Domuz circovirüs-3 enfeksiyonu | *Circoviridae-Circovirus* |
| | Domuz pegivirüs enfeksiyonu | *Flaviviridae-Pegivirus* |
| | Yalancı kuduz | *Herpesviridae-Varicellovirus* |
| | Avrupa domuz vebası | *Flaviviridae-Pestivirus* |
| | Afrika domuz vebası | *Asfarviridae-Asfivirus* |
| | Domuzların veziküler hastalığı | *Picornaviridae-Enterovirus* |
| | Porcine bocavirüs enfeksiyonu | *Parvoviridae-Bocaparvovirus* |
| **At** | Batı at ensefalitisi | *Togaviridae-Alphavirus* |
| | St. Louis encephalitisi | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| **Kedi-Köpek** | Feline coronavirüs | *Coronaviridae-Alphacoronavirus* |
| | Canine parvovirüs-2 | *Parvoviridae-Parvovirus* |
| **Kanatlı hayvanlar** | Avian influenza | *Orthomyxoviridae-Alphainfluenzavirus* |
| | Avian infeksiyöz bronşitis | *Coronaviridae-Gamacoronavirus* |
| | İnferksiyöz bursal hastalık | *Birnaviridae-Avibirnavirus* |
| | Newcastle hastalığı | *Paramyxoviridae-Avulavirus* |
| | Kanatlı adenovirüs (Grup I) | *Adenoviridae-Aviadenovirus* |
| | Kanatlı orthoreovirüs enfeksiyonu | *Reoviridae-Orthoreovirus* |
| | Columbid herpesvirüs-1 (Güvercin) | *Herpesviridae-Mardivirus* |
| | Tavuk anemisi | *Anelloviridae-Gyrovirus* |
| | Tembusu virüs enfeksiyonu | *Flaviviridae-Flavivirus* |
| | Papağan bornavirüs-4 enfeksiyonu | *Bornaviridae-Bornavirus* |

## SONUÇ

Farklı çalışma prensiplerine sahip moleküler teşhis yöntemleri insan ve hayvanların enfeksiyöz hastalıklarının tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. İzotermal amplifikasyon yöntemlerinin ise birçok viral hastalığın teşhisinde hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiği bilimsel olarak gösterilmiştir. Sonuç olarak, PCR metoduna kıyasla izotermal amplifikasyon yöntemlerinin daha uygun maliyetli ve kolay ulaşılabilir olması sebebiyle insan ve hayvan hastalıklarının endemik olduğu bölgelerde birçok hastalığın hızlı, güvenilir ve ucuz maliyetle teşhis edilmesine katkı sağlayacaklardır.

**KAYNAKLAR**

Boyle DS, McNerney R, Teng Low H, Leader BT, Pérez-Osorio AC, Meyer JC, O'Sullivan DM, Brooks DG, Piepenburg O, Forrest MS 2014. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis by recombinase polymerase amplification. PLoS ONE, 9(8), 1–9.

Coertse J, Weyer J, Nel LH, Markotter W 2019. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of canine associated rabies virus in Africa. PLoS ONE, 14(7), 1–15.

Compton J 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature, 350(6313), 91–92.

Estrela PFN, Mendes G de M, de Oliveira KG, Bailão AM, Soares CM de A, Assunção NA, Duarte GRM 2019. Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. Journal of Virological Methods, 271(May), 113675.

Froussard P 1993. rPCR: A powerful tool for random amplification of whole RNA sequences. Genome Research, 2(3), 185–190.

Gill P, Ghaemi A 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologie-A review. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 27, 224–243.

Gingeras TR, Prodanovich P, Latimer T, Guatelli JC, Richman DD, Barringer KJ 1991. Use of self-sustained sequence replication amplification reaction to analyze and detect mutations in zidovudine-resistant human immunodeficiency virus. Journal of Infectious Diseases, 164(6), 1066–1074.

Grabarczyk P, Van Drimmelen H, Kopacz A, Gdowska J, Liszewski G, Piotrowski D, Górska J, Kuśmierczyk J, Candotti D, Łętowska M, Lelie N, Brojer, E. (2013). Head-to-head comparison of two transcription-mediated amplification assay versions for detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus Type 1 in blood donors. Transfusion, 53(10 pt 2), 2512–2524.

Hardinge P, Murray JAH 2019. Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop- Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. Scientific Reports, (April), 1–13.

Höfler H, Pütz B, Mueller J, Neubert W, Sutter G, Gais P 1995. In situ amplification of measles virus RNA by the self-sustained sequence replication reaction. Lab Invest, 73(4), 577–585.

Kim HJ, Tong Y, Tang W, Quimson L, Cope VA, Pan X, … Yen-Lieberman B 2011. A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. Journal of Clinical Virology, 50(1), 26–30.

Kwoh DY, Davis GR, Whitfield KM, Chappelle HL, DiMichele LJ, Gingeras TR 1989. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(4), 1173–1177.

Lau LT, Fung YWW, Yu ACH 2006. Detection of Animal Viruses Using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA). Dev Biol (Basel). Basel, 126, 7–15.

Li L, Bao J, Wu X, Wang Z, Wang J, Gong M, Liu C, Li J 2010. Rapid detection of peste des petits ruminants virus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. Journal of Virological Methods, 170(1–2), 37–41.

Lu W, Yuan Q, Yang Z, Yao B 2017. Self-primed isothermal amplification for genomic DNA detection of human papillomavirus. Biosensors and Bioelectronics, 90(July 2016), 258–263.

Mori Y, Notomi T 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. Journal of Infection and Chemotherapy, 15(2), 62–69.

Mukhopadhyay HK, Amsaveni S, Matta SL, Antony PX, Thanislass J, Pillai RM 2012. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of canine parvovirus DNA directly in faecal specimens. Letters in Applied Microbiology, 55(3), 202–209.

Nagamine K, Hase T, Notomi T 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes, 16(3), 223–229.

Okuwa Y, Miyamato-Hayashi M, Tanaka T, Hayakawa Y, Inoshima Y 2017. Simple and rapid method for routine screening of bovine leukemia virus by loopmediated isothermal amplification assay. Journal of Veterinary Medical Science, 79(1), 137–140.

Özerol İH 1997. İnfeksiyöz hastalıklatın tanısında kullanılan DNA probları ve nükleik asid çoğlatma (amplifikasyon) yöntemleri. Journal of Turgut Özal Medical Center, 4(3), 329–344.

Park JY, Park S, Park YR, Kang DY, Kim EM, Jeon HS, Kim JJ, Kim WI, Lee KT, Kim SH, Lee KK, Park CK 2016. Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the visual detection of European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. Journal of Virological Methods, 237, 10–13.

Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA 2006. DNA detection using recombination proteins.

PLoS Biology, 4(7), 1115–1121.
Sakurai A, Shibasaki F 2012. Updated values for molecular diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus. Viruses, 4, 1235–1257.
Tarhan G 2002. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemleri. Güncel Gastroenteroloji, 6(3), 177–183.
Tezel A, Özkök S, Çalım D, Burkan ZT, Akçelik EN, Koluman A 2010. Tek tüpte mikrobiyolojik tanı: Loop-mediated isothermal amplication (LAMP). Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Dergisi, 1(1), 13–20.
Troger V, Niemann K, Gartig C, Kuhlmeier D 2015. Isothermal amplification and quantification of nucleic acids and its use in microsystems. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 6(3), 1–19.
Tüney İ, Altay A, Ergünay K, Önder SÇ, Usubütün A, Salman MC, Bozdayı G, Karabulut E, Badur OS,Yüce K, Pinar A 2017. HPV types and E6/E7 mRNA expression in cervical samples from Turkish women with abnormal cytology in Ankara, Turkey. Turkish Journal of Medical Sciences, 47(1), 194–200.
Vincent M, Xu Y, Kong H 2004. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. EMBO Reports, 5(8), 795–800.
Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP 1992. Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acids Research, 20(7), 1691–1696.
Wang K, Shao H, Pei Z, Hu G 2016. Rapid detection of contagious ecthyma by loop-mediated isothermal amplification and epidemiology in Jilin province China. Journal of Veterinary Medical Science, 78(1), 125–128.
Wheeler SS, Ball CS, Langevin SA, Fang Y, Coffey LL, Meagher RJ 2016. Surveillance for western equine encephalitis, St. Louis encephalitis, and West Nile viruses using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. PLoS ONE, 11(1), 1–17.
Zanoli LM, Spoto G 2013. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. Biosensors, 3(1), 18–43.

# Zeytinyağı Endüstrisi Atıksularının Kitosan Koagülasyonu ile Ön Arıtımı

Ezgi Oktav Akdemir

Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

ezgi.oktav@deu.edu.tr

**Özet**

Zeytinyağı üretimi Akdeniz bölgesindeki en önemli tarımsal faaliyetlerden biridir ve birçok Akdeniz ülkesi için ekonomik olarak önemlidir. Zeytinyağı endüstrisi atıksuyu (karasu), zeytinyağı üretim aşamalarında meydana gelen sayısız işlemden kaynaklanan önemli bir sıvı atıktır. Karasuyun bertarafı, özellikle yüksek organik madde, askıda katı madde, fenolik bileşik içeriği ve asidik pH değeri ile Akdeniz bölgesinde ciddi bir çevresel sorundur. Bu çalışmada karasuyun kitosan koagülasyonu ile kimyasal olarak ön arıtımı araştırılmıştır. Kitosan koagülasyonunun Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOI) giderme verimi üzerindeki etkisi Box-Behnken istatistiksel deney tasarımı ile belirlenmiştir. Bu yöntem, üç bağımsız değişkenin (kitosan konsantrasyonu, yavaş karıştırma ve çökeltme süresi) tepki fonksiyonu (KOI verimliliği) üzerindeki etkilerini araştırmak ve KOI giderme verimini en üst düzeye çıkaran optimum koşulları belirlemek için kullanılmıştır. Çalışma kapsamında Design expert programı kullanılmış, gözlemlenen ve tahmin edilen KOİ giderme verimleri arasındaki korelasyon katsayısı ($R^2$) 0.979 olarak bulunmuştur. Bu sonuç, gözlemlenen ve tahmin edilen değerler arasında mükemmel bir uyum olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Box-Behnken istatistiksel deney tasarımı, Karasu, Kitosan, Zeytinyağı endüstrisi.

**İngilizce Başlık: Times new roman, 11 punto, bold ve sadece başlığın ilk harfi büyük**

**Abstract**

Olive oil production is one of the most important agricultural activities in the Mediterranean region and is economically important for many Mediterranean countries. Olive oil mill wastewater (OMW) is an important liquid waste resulting from the numerous processes that occur during the olive oil production stages. OMW disposal is a serious environmental problem in the Mediterranean region, especially with its high organic matter, suspended solids, phenolic compound content and acidic pH value. In this study, chemical pretreatment of OMW by chitosan coagulation was investigated. The effect of chitosan coagulation on Chemical Oxygen Demand (COD) removal efficiency was determined by Box-Behnken statistical experiment design. This method has been used to investigate the effects of three independent variables (chitosan concentration, slow mixing and precipitation time) on the response function (COD removal efficiency) and to determine optimum conditions that maximize COD removal efficiency. Within the scope of the study, the Design expert program was used, and the correlation coefficient ($R^2$) between the observed and estimated COD removal efficiencies was found to be 0.979. This result shows that there is a perfect aggrement between the observed and predicted values.

**Keywords:** Box-Behnken statistical experiment design, Olive mill wastewater, Chitosan, Olive oil industry.

## GİRİŞ

Zeytinyağı üretimi sırasında ana ürün olan zeytinyağı dışında sıvı atık olarak karasu ve katı atık olarak da pirina açığa çıkmaktadır. Zeytinyağı değerli bir ürün olmasına rağmen, üretim sırasında yüksek miktarlarda oluşan karasu, Akdeniz ülkelerindeki en önemli çevre sorunları arasında yer almaktadır. Karasuyun kimyasal bileşimi, zeytin tipi, ağaç yaşı, yetiştirme biçimi, zeytin olgunluk seviyesi, coğrafi ve iklim koşulları, uygulanan yağ çıkarma işleminin türü, böcek ilacı ve gübre kullanımı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde değişir (Yay ve ark. 2012). Karasu koyu kahverengi renk, karakteristik hoş olmayan koku, düşük pH, yüksek askıda katı madde içeriği, yüksek bulanıklık ve yüksek organik madde içeriğine sahiptir (Amor ve ark. 2015). Genellikle biyolojik olarak bozunmaya dirençli fenolik bileşikler, polisakkaritler, şekerler, proteinler, lipitler, taninler, pektin ve organik asitler içerir. Yukarıda belirtilen kalıcı organik maddeler çevre üzerinde

olumsuz etkilere neden olabilir. Bu etkiler kötü kokular, su yaşamına yönelik tehditler, toprak doygunluğu, toprak kalitesindeki değişiklikler, doğal sularda renk değişimi, yüzey sularının ötrofikasyonu, yüzeysel ve yeraltı sularında kirlilik ve toksisite olarak sıralanabilir (Pulido 2017).

Karasuyun arıtımı amacıyla uygun ve etkili bir arıtma yöntemi oluşturmak için çeşitli yöntemler denenmiştir. Bu yöntemlerden sıklıkla kullanılanı toprak üzerinde doğrudan uygulama veya lagünlerde buharlaşmadır. Biyolojik arıtma yöntemlerinde aerobik ve anaerobik biyolojik arıtma yöntemleri ile kompostlama denenmiştir (Paraskeva ve Diamaduopulos, 2006). İleri oksidasyon yöntemleri arasında Fenton reaksiyonu, foto-Fenton reaksiyonu ve ozonlama karasuyun arıtımı için kullanılan diğer arıtma yöntemleridir (Mantzavinos 2005; Giannis ve ark. 2007). Ayrıca membran filtrasyonu, koagülasyon/flokülasyon ve elektro koagülasyon gibi fiziko-kimyasal arıtma yöntemleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Iakovides ve diğerleri, 2016).

Karasuyun kimyasal olarak arıtmının araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Pelendridou ve ark. (2014) alüminyum sülfat ve ferrik klorür, nişasta, kitosan ve kireç gibi farklı koagülantlar veya bunların kombinasyonlarını kullanarak deneyler yapmışlar, sonrasında biyofiltre kullanmışlardır. Bu çalışmada elde edilen maksimum KOİ giderme verimi % 65.5'tir. Sarika ve ark. (2005) karasuyun katyonik ve anyonik polielektrolitler, kireç ve $FeCl_3$ ile koagülasyon ve flokülasyonunu incelemişler, katı-sıvı ayrımı sağlamak için minimum pıhtılaştırıcı dozajın 2.5-3 g/L olduğunu bulmuşlardır. Çalışmalarında % 40 Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) ve % 45 Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (BOİ) giderme verimi elde etmişlerdir. Alver ve ark. (2015) $FeSO_4$ ve Fenton prosesi ile arıtımı araştırmışlardır. Ardışık koagülasyon ve Fenton işlemiyle % 65.5 gibi yüksek KOİ giderme verimi elde etmişlerdir. Rizzo ve ark. (2008) doğal organik bir koagülant olan kitosan ile koagülasyon ve ardından fotokataliz (PC), Fenton (F) veya foto-Fenton (PF) gibi ileri oksidasyon işlemleriyle karasuyun arıtımını invelemişlerdir. geri kazanılmasını ele almıştır.bu çalışmada 400 mg/L kitosan dozunda ve 4.3 pH değerinde % 88 katı madde giderimi elde edilmiştir.

Kitosan, biyoteknoloji, biyotıp, mikrobiyoloji ve eczacılıkta uygulanan doğal bir organik koagülanttır. Biyobozunurluk, biyouyumluluk, yüksek adsorpsiyon limiti, antibakteriyel özellikler ve tehlikeli olmayan doğa gibi ilginç özelliklere sahiptir. Organik maddelerin ve patojenlerin, askıda katı maddelerin, bulanıklığın, KOİ ve BOİ'nin gideriminde bir bakterisit ve koagülant olarak kullanılmaktadır (Bergamasco ve ark. 2011).

Bu çalışmada kitosan, zeytinyağı üretimi atık suyundan KOİ giderimi amacıyla koagülant olarak kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kitosan konsantrasyonlarında hızlı karıştırma (koagülasyon), yavaş karıştırma (flokülasyon) ve çökeltim süreçlerinden oluşan jar testi deneyleri yapılmıştır. Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak Box-Behnken istatistiksel deney tasarım yöntemi kullanılmış, kitosan konsantrasyonu, yavaş karıştıma ve çökeltim sürelerinin KOİ giderme verimi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Jar Testi Deneyleri

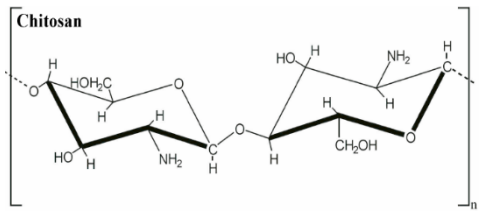
Deneysel çalışmalarda kullanılan laboratuar ölçekli jar testi sistemi, VelpScientifica firmasından F105A0109 koduyla JLT 6 modeli olarak temin edilmiştir. Jar testi düzeneği Şekil 1'de gösterilmektedir. Önceden belirlenen dozlarda kitosan hassas terazide tartılarak 500 ml'lik beherlere alınmış ve üzerlerine ham karasu numunesi eklenmiştir. Önce 200 rpm karıştırma hızında 3 dakika hızlı karıştırma, sonra 40 rpm karıştırma hızında farklı sürelerde yavaş karıştırma işlemi uygulanmıştır. Karıştırma işlemi bitince numuneler farklı sürelerde çökelme işlemine tabi tutulmuştur. Çökelme işlemi sonunda beherlerin üst kısmından pipet yardımı ile örnekler alınarak Standart Medodlara göre (APHA, AWWA, 1998) Kimyasal oksijen İhtiyacı (KOİ) deneyleri yapılmıştır.




**Şekil 1.** Jar testi

## Kitosan

Kitosan bol miktarda ve yenilenebilir bir kaynaktır. Biyolojik olarak parçalanabilir, petrol bazlı ve toksik değildir. Bu nedenle en çok tercih edilen katyonik doğal organik polimerdir (Syafalni ve ark. 2012). Deneysel çalışmalarda kullanılan kitosan yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Sigma-Aldrich firmasından 419419 ürün koduyla elde edilmiş, genel kimyasal yapısı Şekil 2'de verilmiştir.




**Şekil 2.** Kitosanın genel kimyasal yapısı (Syafalni ve ark. 2012).

## Box Behnken Deneysel Tasarım Metodu

Değişkenlerin objektif veya yanıt fonksiyonları üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla deneysel tasarım yapılırken, klasik yaklaşım olarak bir kerede bir değişken değiştirilmektedir. Ancak bu yaklaşım, özellikle çok değişkenli sistemler için ve ayrıca birden fazla yanıt düşünüldüğünde zaman alıcı bir yöntem olmaktadır. Deneylerin istatistiksel tasarımı ise, gerçekleştirilecek deney sayısını azaltır, değişkenler arasındaki etkileşimleri dikkate alır ve çok değişkenli sistemlerde çalışma parametrelerinin optimizasyonu için kullanılabilir. Box-Behnken tasarımı olarak bilinen modifiye edilmiş merkezi kompozit deneysel tasarım, az sayıda çalışma yaparak (örneğin, üç parametreli bir deneysel tasarım için 15 çalışma) yanıt fonksiyonunun

hesaplanmasını ve incelenen aralıktaki herhangi bir deney noktasında sistem performansının tahmin edilmesini sağlar (Ay ve ark. 2009).

Bu çalışmada üç bağımsız değişkenin yanıt fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştırmak ve KOİ giderme verimini en üst düzeye çıkaran koşulları belirlemek için Box–Behnken istatistiksel deney tasarımı kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler kitosan konsantrasyonu ($X_1$), yavaş karıştırma süresi ($X_2$) ve çökeltim süresidir ($X_3$). Bağımlı değişken (veya yanıt fonksiyon) ise KOİ giderme verimidir ($Y_1$). Her bağımsız değişkenin düşük, orta ve yüksek seviyeleri Tablo 1'de gösterildiği gibi sırasıyla −1, 0 ve +1 olarak belirlenmiştir. Kitosan konsantrasyonu ($X_1$) 100-600 mg/L, yavaş karıştırma süresi ($X_2$) 30-45 dakika, çökeltim süresi ($X_3$) 60-120 dakika aralığında seçilmiş ve toplamda 15 adet deney yapılmıştır.

*Tablo 1. Deney noktalarının belirlenmesi*

| **Bağımsız değişken** | **Sembolü** | **Kodlanmış hali** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Kitosan konsantrasyonu, mg/L | $X_1$ | 100 | 350 | 600 |
| Yavaş karıştırma süresi, dakika | $X_2$ | 30 | 37.5 | 45 |
| Çökeltim süresi, dakika | $X_3$ | 60 | 90 | 120 |

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Karasu Numunesinin Karakterizasyonu

Deneyler sırasında kullanılan karasu numunesi İzmir ilinde bulunan ve 3-fazlı üretim yapan bir zeytinyağı üretim tesisinden alınmıştır. Numuneler karanlık ortamda 4°C'de muhafaza edilmiştir. Ham karasu numunesine ait kirlilik karakteristikleri Tablo 2'de verilmektedir.

**Tablo 2.** Ham karasu numunesinin karakterizasyonu

| **Parametre** | **Birim** | **Değer** |
|---|---|---|
| pH | - | 5.4 |
| KOİ | mg/L | 120000 |
| TOK | mg/L | 31650 |
| AKM | mg/L | 33200 |
| Yağ-Gres | mg/L | 11940 |

### Box–Behnken Deneysel Tasarım Metodu Sonuçları

Bağımlı ve bağımsız değişkenlerin değerleri ile deneysel veriler her deney için Tablo 3'de sunulmaktadır. Merkez noktası (0, 0, 0) üç kez tekrarlanmış ve verilerin tekrarlanabilirliğini gösteren hemen hemen aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Box–Behnken istatistiksel deney tasarım metodu, yanıt fonksiyonu ile bağımsız değişkenler arasında ampirik bir ilişki sunmaktadır. Yanıt fonksiyonu (Y) ve bağımsız değişkenler (X) arasındaki matematiksel ilişki, aşağıdaki şekilde ikinci dereceden bir polinom denklemi ile tahmin edilebilir:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{11} x_{1^2} + b_{22} x_{2^2} + b_{33} x_{3^2} \quad (1)$$

Burada Y: verim, $b_0$: sabit, $b_1$,$b_2$,$b_3$: doğrusal katsayılar, $b_{12}$,$b_{13}$,$b_{23}$: çapraz ürün katsayıları, $b_{11}$,$b_{22}$,$b_{33}$: ikinci dereceden katsayılardır.

**Tablo 3.** Box-Behnken deney tasarımına göre kodlanmış değerler ve cevap değerleri

| **Deney numarası** | **$X_1$ (mg/L)** | | **$X_2$ (dakika)** | | **$X_3$ (dakika)** | | **$Y_1$ (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | (-1) | 100 | (0) | 37.5 | (+1) | 120 | 48 |
| 2 | (0) | 350 | (0) | 37.5 | (0) | 90 | 46 |
| 3 | (-1) | 100 | (-1) | 30 | (0) | 90 | 53 |
| 4 | (+1) | 600 | (0) | 37.5 | (+1) | 120 | 42 |
| 5 | (-1) | 100 | (0) | 37.5 | (-1) | 60 | 48 |
| 6 | (0) | 350 | (-1) | 30 | (+1) | 120 | 47 |
| 7 | (0) | 350 | (0) | 37.5 | (0) | 90 | 46 |
| 8 | (0) | 350 | (+1) | 45 | (-1) | 60 | 48 |
| 9 | (+1) | 600 | (+1) | 45 | (0) | 90 | 49 |
| 10 | (-1) | 100 | (+1) | 45 | (0) | 90 | 44 |
| 11 | (0) | 350 | (-1) | 30 | (-1) | 60 | 47 |
| 12 | (0) | 350 | (0) | 37.5 | (0) | 90 | 46 |
| 13 | (+1) | 600 | (0) | 37.5 | (-1) | 60 | 48 |
| 14 | (+1) | 600 | (-1) | 30 | (0) | 90 | 44 |
| 15 | (0) | 350 | (+1) | 45 | (+1) | 120 | 43 |

Design Expert 7.0 regresyon programı kullanılarak bağımlı değişken için yanıt fonksiyonunun katsayıları, deneysel sonuçlar ile cevap fonksiyonları arasındaki korelasyon saptanmıştır. KOİ giderme verimi ($Y_1$) için belirlenmiş katsayılara sahip yanıt fonksiyonu aşağıda eşitlik (2)'de verilmiştir.

$$Y_1 = 69.665 + 0.0668\ X_1 + 1.10333\ X_2 - 0.3075\ X_3 + 0.001867\ X_1X_2 - 0.0002\ X_1X_3 - 0.00556X_2X_3 + 0.000014x_{1^2} + 0.0111x_{2^2} - 0.000417x_{3^2} \quad (2)$$

Yanıt fonksiyonundaki katsayıların işaretleri ve büyüklükleri bağımsız değişkenlerin yanıt fonksiyonu üzerindeki etkisini göstermektedir. Eşitlik (2)'ye bakıldığı zaman KOİ giderme veriminin çökeltim süresi ($X_3$) ile azaldığı, kitosan konsantrasonu ($X_1$) ve yavaş karıştırma süresi ($X_2$) ile ise arttığı görülmektedir. Kitosan konsatrasyonu katsayısı diğer katsayılardan daha küçük olduğu için verim üzerinde etkisinin daha düşük olduğu söylenebilir.

Yanıt (KOİ giderme verimi) için varyans analizi (ANOVA) testleri de yapılmış ve sonuçları Tablo3'de sunulmuştur. Tablo 4'de görüldüğü gibi, Model F- değeri 76.19 olarak hesaplanmıştır. Bu değer modelin istatistiki açıdan önemli olduğunu göstermektedir. 0.05'den daha küçük Prob>F değerleri belirlenen değişkenlerinin istatistiki açıdan önemli olduğunu göstermektedir. Buna dayanarak $X_1$, $X_2$, $X_3$, $X_1X_2$, $X_1X_3$, $X_2X_3$, $X_1^2$ ve $X_2^2$ terimlerinin önemli model terimleri olduğu söylenebilir. Model $R^2$ değeri 0.9928 olarak elde edilmiştir. Tahmini ve hesaplanmış $R^2$ değerleri ise 0.8842 ve 0.9797 olarak hesaplanmış olup bu iki değer birbiri ile istatistiki açıdan yeterince uyumludur. Elde edilen 3 boyutlu model grafiğinin uygunluk hassasiyeti (adeq. Prec.) değerinin 4'ten büyük olması gerekmektedir. Yapılan veri analizi neticesinde bu değer 33.994 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle tasarım alanı, sonuçların 3 boyutlu grafiksel gösterimi için uygundur.

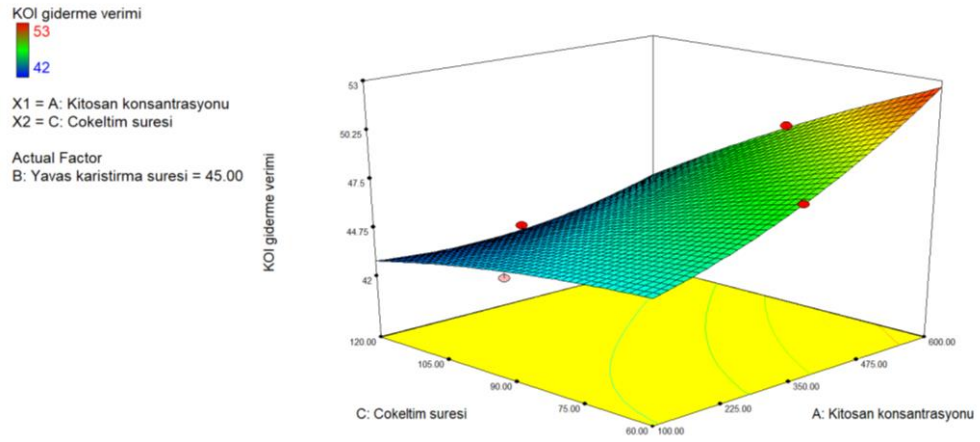
**Tablo 4.** KOİ giderimi için varyans analizi (ANOVA)

| Terimler | Kareler toplamı | Serbestlik derecesi | Kareler ortalaması | F-değeri | p-değeri Prob > F |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 102.85 | 9 | 11.43 | 76.19 | < 0.0001 |
| $X_1$ | 12.50 | 1 | 12.50 | 83.33 | 0.0003 |
| $X_2$ | 6.13 | 1 | 6.13 | 40.83 | 0.0014 |
| $X_3$ | 15.13 | 1 | 15.13 | 100.83 | 0.0002 |
| $X_1 X_2$ | 49.00 | 1 | 49.00 | 326.67 | < 0.0001 |
| $X_1 X_3$ | 9.00 | 1 | 9.00 | 60.00 | <0.0006 |
| $X_2 X_3$ | 6.25 | 1 | 6.25 | 41.67 | 0.0013 |
| $X_1^2$ | 2.83 | 1 | 2.83 | 18.85 | 0.0074 |
| $X_2^2$ | 1.44 | 1 | 1.44 | 9.62 | 0.0268 |
| $X_3^2$ | 0.52 | 1 | 0.52 | 3.46 | 0.1219 |
| Residual | 0.75 | 5 | 0.15 | | |
| Cor Toplam | 103.60 | 14 | | | |

**KOİ Giderme Verimi**

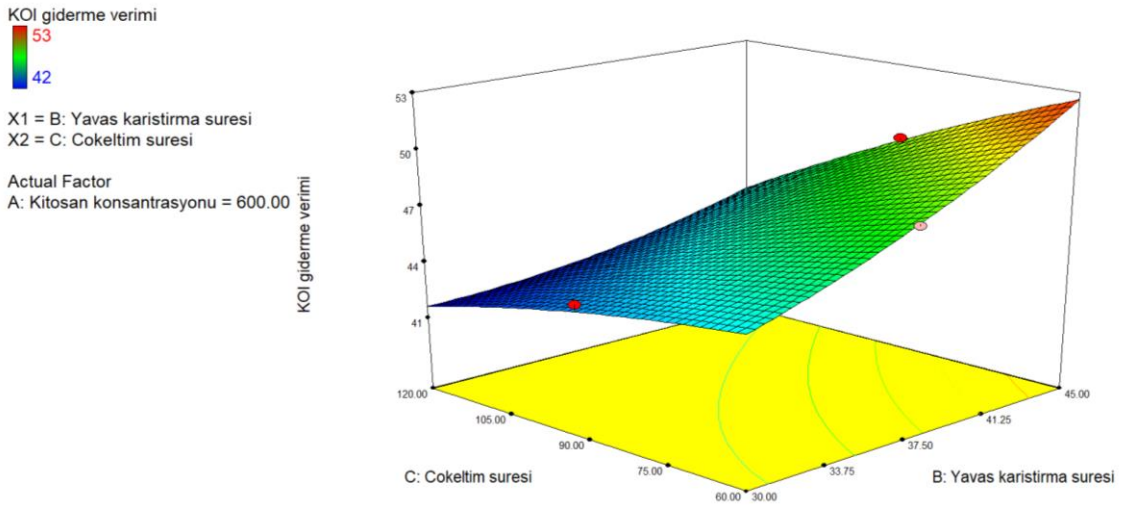
Yapılan deneysel çalışmalarda farklı dozlarda kitosan tartılarak 500 ml beherlere alınmış, üzerlerine ham karasu numunesi eklenmiştir. Önce 3 dakika hızlı karıştırma, sonra belirli sürelerde yavaş karıştırma ve son olarak da önceden belirlenmiş sürelerde çökeltim işlemi uygulanmıştır. Üst sudan numune alınmış, KOİ analizi yapılarak KOİ giderme verimindeki değişiklikler incelenmiştir.

KOİ giderme veriminin kitosan konsantrasyonu ve çökeltim süresi ile değişimi Şekil 3'de görülmektedir. Yavaş karıştırma süresi 45 dakikada sabit tutulmuştur. Kitosan konsantrasyonundaki artış verimi de arttırmaktadır. Atıksuya eklenen biyolojik katyonik polimerin dozu arttıkça daha fazla katı ve organik madde çökeltilerek KOİ konsantrasyonu azalmış, dolayısıyla verim artmıştır. 100 mg/L kitosan konsantrasyonunda elde edilen KOİ giderme verimi %44 iken, 600 mg/L kitosanda verim %53'e çıkmıştır. Çökeltim süresindeki artış ise verim üzerinde çok etkili olmamıştır. Sürenin 60 dakikadan 120 dakika çıkması verimde % 1'lik bir azalmaya neden olmuştur. Dolayısıyla en yüksek KOİ giderme verimi 600 mg/L kitosan konsanstrasyonunda ve 60 dakikalık çökeltim süresinde elde edilmiştir.




**Şekil 3.** KOİ giderme veriminin kitosan konsantrasyonu ve çökeltim süresi ile değişimi

KOİ giderme veriminin yavaş karıştırma ve çökeltim süreleri ile değişimi Şekil 4'de verilmiştir. Kitosan konsantrasyonu en yüksek verimin elde edildiği konsantrasyon olan 600 mg/L'de sabit tutulmuştur. Yavaş karıştırma süresi arttıkça daha fazla yumak oluşumu gerçekleşmiş ve dolayısıyla daha fazla katı madde ile organik maddenin giderimi sağlanmıştır. 30 dakikalık yavaş karıştırma süresinde elde edilen KOİ giderme verimi % 42 iken bu sürenin 45 dakikaya çıkmasıyla verim de % 53'e çıkmıştır. Çökeltim süresindeki değişim ise, Şekil 3'deki grafikle benzer olarak, KOİ giderme verimini çok fazla değiştirmemiştir.




**Şekil 4.** KOİ giderme veriminin yavaş karıştırma ve çökeltim süreleri ile değişimi

## SONUÇ

Bu çalışmada, zeytinyağı üretimi sırasında sıvı atık olarak açığa çıkan karasudan koagülasyon-flokülasyon işlemi ile KOİ giderimi amacıyla kitosanın kullanılabilirliği araştırılmıştır. Box-Behnken deneysel tasarım metodunun kitosan koagülasyonu ile KOİ giderimi için istatistiksel olarak güvenilir sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır. Yapılan varyans analizi sonunda Model $R^2$ değeri 0.9928, tahmini ve hesaplanmış $R^2$ değerleri ise 0.8842 ve 0.9797 olarak bulunmuştur. Yanıt fonksiyonundan elde edilen tahminler, kullanılan

metodolojinin güvenilirliğini gösteren deneysel sonuçlarla iyi bir uyum içindedir. Bu da kullanılan yöntemin istatistiki açıdan uygun olduğunu göstermektedir.

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda KOİ giderme veriminin artan kitosan konsantrasyonu ve yavaş karıştırma süresi ile arttığı, çökeltim süresindeki artışın ise verim üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. En yüksek KOİ giderme veriminin (% 53) elde edildiği koşullar 600 mg/L kitosan konsantrasyonu, 45 dakika yavaş karıştırma süresi ve 60 dakika çökeltim süresidir.

## KAYNAKLAR

Alver A, Bastürk E, Kılıc A, Karatas M 2015. Use of advance oxidation process to improve the biodegradability of olive oil mill effluents., Process Safety and Environmental Protection, 98: 319–324.

Amor C, Lucas MS, García J, Dominguez JR, De Heredia JB, Peres JA 2015. Combined treatment of olive mill wastewater by Fenton's reagent and anaerobic biological process. Journal of Environmental Science and Healt: Part A, 50: 161-168.

APHA, AWWA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (twentieth ed.), American Public Health Association, Washington, DC, USA 1998.

Ay F., Catalkaya EC., Kargi F. 2009. a statistical experiment design approach for advanced oxidation of direct red azo-dye by photo-fenton Treatment. Journal of Hazardous Materials, 162: 230–236.

Bergamasco R, Konradt-Moraes LC, Vieira MF, Fagundes-Klen MR, Vieira AMS 2011. Performance of a coagulation-ultrafiltration hybrid process for water supply treatment. Chemical Engineering Journal, 166: 483-489

Giannis A, Kalaitzakis M and Diamadopoulos E 2007. Electrochemical treatment of olive mill wastewater. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 82:663–671

Iakovides, I C, Pantziaros, A G, Zagklis, D P, Paraskeva CA 2016. Effect of electrolytes/polyelectrolytes on the removal of solids and organics from olive mill wastewater, Journal of Chemıcal Technology and Bıotechnology, 91 (1) 204-211.

Mantzavinos D and Kalogerakis N 2005. Treatment of olive mill effluents: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes: An overview, Environmental International, 31:289–295.

Ochando-Pulido JM, Martínez-Ferez P 2017. Experimental design optimization of reverse osmosis purification of pretreated olive mill wastewater. Science of Total Environmental, 587–588: 414–422.

Paraskeva P and Diamadopoulos E 2006. Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: A review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81:1475–1485.

Pelendridou K, Michailides MK, Zagklis DP, Tekerlekopoulou AG, Paraskeva CA, Vayenas DV 2014. Treatment of olive mill wastewater using a coagulation-flocculation process either as a single step or as post-treatment after aerobic biological treatment. Journal of Chemical Technology Biotechnology, 89: 1866–1874.

Rizzo L, Lofrano G, Grassi M, Belgiorno V 2008. Pretreatment of olive mill wastewater by chitosan coagulation and advanced oxidation processes, Seperation and Purification Technology 63: 648–653.

Sarika R, Kalogerakis N, Mantzavinos D 2005. Treatment of olive mill effluents. Part II. Complete removal of solids by direct flocculation with polyelectrolytes, Environmental International 31: 297–304.

Syafalni S., Abustan A., Zakaria SNF., Zawawi MH., Rahim RA. 2012. Raw water treatment using bentonite-chitosan as a coagulant. Water Supply, 12 (4): 480–488.

Yay ASE, Oral HV, Onay TT, Yenigün O 2012. A study on olive oil mill wastewater management in Turkey: a questionnaire and experimental approach. Resource Conservation Recycling 60: 64-71.

# Antimicrobial Activity of Different Extracts of *Tragopogon porrifolius* and Anchusa leptophylla

HülyaHoşgören[a*], Fatma Matpan Bekler[a]

[a]*Department of Biology, Faculty of Science, Dicle University, 21280 Diyarbakır, Turkey*

*Corresponding author. E-mail: hulyah@dicle.edu.tr

## Abstract

Antimicrobial resistance is a growing problem in modern healthcare around the world. Natural plants can be considered as a vital source for antimicrobial agents instead of synthetic drugs because their costs and side effects. In this study, antimicrobial effects of *Tragopogon porrifolius*L. and *Anchusa leptophylla* Roem. &Schult plants sold in the local markets of Diyarbakır were investigated. All plant samples were extracted with four different solvents (sterile distilled water, ethanol, methanol and *n*-hexane). The antibacterial effect of all plant extracts was evaluated using *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Aquatic extract of *A. leptophylla* showed antimicrobial activity against *K. pneumoniae*. The ethanolic extract of *A. leptophylla* is effective on *E.coli, S. aureus and K. pneumoniae*, while methanolic extract of *T. porrifolius* is highly effective on *S. aureus.* In addition *S. aureus* is affected by *n*-hexane extract of *A. leptophylla* and *T. porrifolius.*

**Keywords:** *Anchusa leptophylla*, antimicrobial, *Tragopogon porrifolius*

## INTRODUCTION

Turkey is among the countries that are rich in terms of plant species as it is under the influence of its geographical position, geomorphological structure and various types of climates. (Özhatay et al., 2009; Atik et al., 2010). These plants, which are found in natural flora, are used for various purposes such as treatment, food, tea, spice, paint, resin, gum, soft drink and cosmetic industry (Faydaoğlu and Sürücüoğlu, 2011).

Especially wild weeds are used as herbs in salads and foods in cooked or uncooked forms in times where fruits and vegetables are expensive or rarely available (Siyamoğlu, 1984). Nevertheless, most of these plants are consumed without awareness of their chemical compositions and medical significance. In fact, in addition to being a significant source of vitamins, minerals, fibres and proteins, these weeds also include important components that have high antioxidant activity (Yücel et al., 2012).

With the presence of antibiotics, it is considered that infectious diseases are almost completely eliminated by health institutions. However, excessive use of antibiotics has led to the emergence of multiple drug resistance in many microorganism groups. (Costa et al., 2009; Khan et al., 2009). Bacterial infections with this multiple drug resistance; they lead to increased deaths, increased healing processes and high costs throughout busure.

Indeed, despite this high level of plant diversity, studies on identification, purposes of usage and determination of nutritional values for wild plants that are consumed are highly limited (Siyamoğlu, 1984; Doğan et al., 2004; Şekeroğlu et al., 2005; Demir, 2006; Özbucak et al., 2007; Yücel et al., 2010).

For this reason, this study investigated the antimicrobial effects of *Tragopogon porrifolius* L. and *Anchusa leptophylla* Roem. &Schult, which are consumed as food and subjects of our study. This way, it was aimed to determine the plants in Turkey that naturally grow and have medical properties and contribute to existing and future studies on this matter.

### *T. porrifolius*

It is in the family of Asteraceae and known as “Salsify” in the region (Fig. 1). It has yellow flowers that grown in mountains, meadows and fields by themselves. It is utilised with all parts in foods. According to Matthews (1975), *Tragopogon* is represented by 18 species in Turkey, but this number reaches 25 together with

doubtfully recorded and recently described taxa (Coşkunçelebi and Gültepe, 2012). Some of the species in the genus have antibiotic and laxative effects and are used in treatment for hypertension.(Korkmaz and Karakurt 2015)

***A. leptophylla***

It is a species of the Boraginaceae family and known as "Alkanet" in the region (Fig. 2). The leaves of the plant are used in cooking. There are 15 species of the genus *Anchusa* L. (Boraginaceae) found among the flora of Turkey (Chamberlain, 1978). Several species of *Anchusa* are used in folk medicine (Dafni et al., 1984), rheumatism, arthritis, gout (Ali-Shtayeh et al., 2000; El Beyrouthy et al., 2009), stomach diseases, and weight loss (Al-Qura'n, 2009). In other instances, *Anchusa* is used as a diuretic agent (Baytop, 1984).





**Figure1.***T. porrifolius*Photo:Mehmet Sinkil **Figure 2.** *A. leptophylla* Photo: Yavuz Aydın

## 2. MATERIAL AND METHOD

### 2.1. Plants and preparation of extracts

In this study, *T. porrifolius* (Salsify) and *A. leptophylla* (Alkanet) were obtained from local market in Diyarbakır, Turkey. The collected plants were washed with distilled water and dried in shade. The dried plant material of each plant was grinded with a blender. All plant samples (1.0 g) were separately dissolved in 10 mL each of sterile distilled water, 99% ethanol (Sigma), 99.7% methanol (Sigma) and 95% *n*-hexane (Merck) at room temperature for 24 h. All samples were centrifuged at 10.000 rpm for 10 min and the supernatants were stored at room temperature in separate clean tubes until required further analyses.

### 2.2. Bacterial strains

The antibacterial potency of each plant extract was evaluated using four bacterial strains (*Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) used as test microorganisms were provided from the culture collections of the Medical Microbiology Laboratory, Research Hospital of Dicle University in Diyarbakir, Turkey. The isolates were separately sub-cultured in liquid Mueller-Hinton Broth (MHB, Sigma) and incubated at 37°C for overnight (18–24 h) in a shaker. The culture was harvest edusing 5 ml of sterile 0.9% salt solution, its absorbance was adjusted at to a 0.5 McFarland turbidity standard ($5 \times 10^5$CFU/mL) using spectrophotometer.

### 2.3. Antibacterial activity

The disk diffusion test was made according to Murray et al. (1995) methodology for the antibacterial activity. Mueller-Hinton agar (MHA, Sigma) was sterilized and dispensed into sterile plates, then all plates were dried at 37°C for 2 h under the sterile conditions. The cultures inoculated on MHA then allowed the surface of the medium to dry for 3-5 minutes.The plant extract residues (50 mg) were re-dissolved in 2.5 mL of solvents (distilled water, ethanol, methanol and *n*-hexane) sterilized through Millipore filter (0.22µm) then20 µL of the plant extract loaded over sterile paper discs (6 mm in diameter, Oxoid) to obtain final concentration of 10 g/disc. Sterile paper discs loaded with plant extract were placed on the top of plates. The plates were kept in the fridge at 5 °C for 2 h to permit plant extracts diffusion then incubated at 37 °C for 24 h. An antibiotic disc of Gentamycin (10 µg/ disc) was also used as positive control. Absolute solvents (distilled water, ethanol, methanol and *n*-hexane) were used as negative controls. After incubation, all plates were observed for zones of growth inhibition and the diameter of these zones was measured in millimeters. No inhibition zone indicated a disk diffusion zone of 6 mm, i.e., growth up to the edge of a 6-mm disk. All tests were performed under sterile conditions in triplicate.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Recently, researchers have interested about the antimicrobial properties of different extracts from plants. It is known that *S. aureus* and *Enterobacter* cause nosocomial infections in hospital and *E. coli*, the main agents causing urinary tract infections (Bar-Oz et al., 2001). *K. pneumonia* cause various infections like urinary tract infections, intra-abdominal infection, skin and soft tissue infections, and pneumonia (Lin et al. 2016). Antimicrobial resistance is a growing problem in modern healthcare around the world. Natural plants can be considered as a vital source for antimicrobial agents instead of synthetic drugs because their costs and side effects. Therefore, it is important to find out new, effective, safer natural antimicrobial agents (Prasad, 2014).

In this study, antimicrobial assay was performed with different solvent (aquatic, ethanolic, methanolic and *n*-hexane) *T. porrifolius* and *A. leptophylla* extracts against some of the pathogenic microorganisms like *E. faecalis, E. coli, K. pneumoniae* and *S. aureus.* The all extracts of all the samples showed an inhibition zone against the pathogenic microorganisms.

Plants are traditionally used as tea or spices in the kitchens and are often brewed in water or directly added on to foods. For this reason, in this study, aquatic extracts of *A. leptophylla* and *T. porrifolius* were used to determine antimicrobial effect. The highest antimicrobial activity of aquatic extract of *A. leptophylla* was 12±4.7 mm against *K. pneumoniae*. Aquatic extract of *A. leptophylla* showed 8±1 and 5±1.2 mm inhibition zone against *E. faecalis* and *E. coli*, respectively (Table 1). It was determined that aquatic extracts of *A. leptophylla* samples showed slightly antibacterial activity and has no effect on *S. aureus.* Aquatic extract of *T. porrifolius* has no effect on these test microorganisms.

**Table 1:** Antimicrobial effect of aqueous extracts on bacteria

| Plant extract | Inhibition zone | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***E. faecalis*** | ***E. coli*** | ***K. pneumoniae*** | ***S. aureus*** |
| *A. leptophylla* | 8±1 | 5±1.2 | 12±4.7 | ND |
| *T. porrifolius* | ND | ND | ND | 7±1.41 |

Diameter of inhibition zone (mm±SD).n=3. ND = Not Determined (no zone of inhibition).

Ethanolic extracts of *A. leptophylla* and *T. porrifolius* showed antibacterial activities against all test microorganisms. The highest antibacterial activity (13±3.7 mm) was determined against *K. pneumoniae* by ethanolic extract of *A. leptophylla* (Table 2). *T. porrifolius* showed slightly antibacterial activity against *E. faecalis, E. coli* and *S. aureus.* Ethanolic extract of *T. porrifolius* has no effect on *K. pneumoniae, A. leptophylla* has no effect on *E. faecalis*.

**Table 2:** Antimicrobial effect of ethanol extracts on bacteria

| Plant extract | Inhibition zone | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***E. faecalis*** | ***E. coli*** | ***K. pneumoniae*** | ***S. aureus*** |
| *A. leptophylla* | ND | 12±2.6 | 13±3.7 | 11±0.7 |
| *T. porrifolius* | 10±0.1 | 11±0.1 | ND | 10±0.1 |

Diameter of inhibition zone (mm±SD).n=3. ND = Not Determined (no zone of inhibition).

Methanolic extracts of all plant samples showed antibacterial activity. Methanolic extract *T. porrifolius* created the highest antimicrobial activity (21±1.4mm) against *S. aureus* and methanolic extracts of alkanet showed antimicrobial activity against *E.coli.* In addition, *T. porrifolius* and *A. leptophylla* showed slightly antimicrobial activity against *K. pneumoniae* (Table 3).

**Table 3:** Antimicrobial effect of methanol extracts on bacteria

| Plant extract | Inhibition zone | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***E. faecalis*** | ***E. coli*** | ***K. pneumoniae*** | ***S. aureus*** |
| *A. leptophylla* | 10±2.3 | 16±2.3 | 9±4.04 | 13±0.7 |
| *T. porrifolius* | ND | 12±1.4 | 7±0.4 | 21±1.4 |

Diameter of inhibition zone (mm±SD).n=3. ND = Not Determined (no zone of inhibition).

Hexane extract of *T. porrifolius* showed slightly antibacterial activity against *E. coli* (9±1.4 mm) and *S. aureus* (8.5±0.7 mm). Hexanic extracts of *A. leptophylla* and *T. porrifolius* has no effect on *E. faecalis* (Table 4).

**Table 4:** Antimicrobial effect of *n*-hexane extracts on bacteria

| Plant extract | Inhibition zone | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***E. faecalis*** | ***E. coli*** | ***K. pneumoniae*** | ***S. aureus*** |
| *A. leptophylla* | ND | ND | 5.3±3.2 | 4±1.2 |
| *T. porrifolius* | ND | 9±1.4 | ND | 8.5±0.7 |

Diameter of inhibition zone (mm±SD).n=3. ND = Not Determined (no zone of inhibition).

When we compare different solvent extract of *T. porrifolius*, we can see the methanolic extract is more effective on *S. aureus*, methanolic extract of *A. leptophylla* shows antimicrobial effect against all test microorganisms (Figure 1). The slightly antibacterial activity was determined against *E.coli*, *S. aureus* and *K. pneumoniae* by *n*-hexane extract of *A. leptophylla* and *T. porrifolius* but the aquatic extract of *T. porrifolius* has no effect on all test microorganisms. The *n*-hexane extract of *Tragopogon oligolepis* demonstrated antimicrobial activity against *Enterobacte raerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* (Uğur et al. 2009).

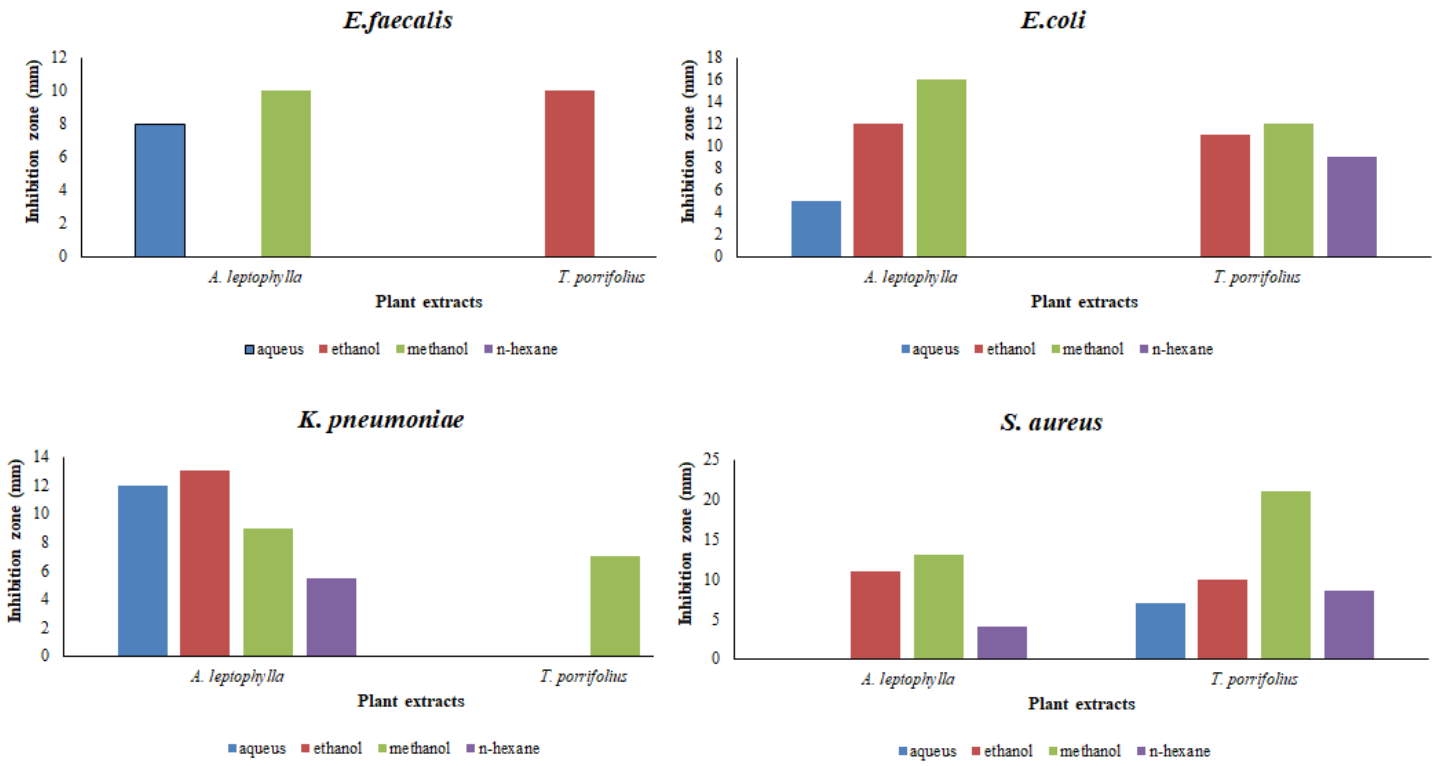



**Figure3.** Comparision of antimicrobial effect of different extracts

Hosein Farzaei et al. (2014) have studied about antibacterial activity of essential oil obtained from *Tragopogon graminifolius*. The essential oil of *T. graminifolius* demonstrated antibacterial activity against *S. aureus* and *K. pneumonia*. Al-Salihi et al. (2009) determined that the volatile and fixed oil extracted from dry flowers of *Anchusa stigosa* showed antibacterial activity against *S. aureus* and *K. pneumoniae*.In addition, the antibacterial activity of the extracted lipid of *Anchusa strigosa* against *S. aureus and K. pneumoniae, E.coli* and *Enterobacter* sp.(Al-Salihi et al. 2007). As we can see the Figure 3only aquatic extract of *A. leptophylla* showed antimicrobial activity against *K. pneumoniae*. The ethanolic extract of *A. leptophylla* is effective on *E.coli, S. aureus and K. pneumoniae*, while methanolic extract of *T. porrifolius* is highly effective on *S. aureus.* In addition *S. aureus* is affected by *n*-hexane extract of *A. leptophylla* and *T. porrifolius.*

## CONCLUSION

The results indicated that different extracts of *A. leptophylla* and *T. porrifolius* could be consumed as a natural herbal preservative or complementary supplement in the food industries.

The results obtained show that the plant extracts used in the study have antibacterial properties and give an idea that wild plants can be evaluated medically.

It is also thought that these extracts may be an alternative to synthetic antibiotics which are known to have more side effects in the treatment of infectious diseases.

## REFERENCES

Ali-Shtayeh MS, Yaniv Z and Mahajna J 2000. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. Journal Ethnopharmacol. 73:221–232.

Al-Qura'n S 2009. Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. J.ournal Ethnopharmacol 123:45–50

Al-Salihi FG, Al-Ameri AK, Al-Juobory TS 2007. Antimicrobial activity of total lipids extracted from *Anchusa strigosa* Lab. Sur Min Raa Journal, 3(6):11-20

Al-Salihi FG, Yasseen AI, Al-Salihi SF 2009. Antimicrobial activity of volatile oil and fixed oil extracted from *Anchusa strigosa* Lab. Tikrit Journal of Pure Science,14(2) :21-24.

Atik AD, Öztekin M, Erkoç F, 2010. Biyoçeşitlilik ve Türkiye'deki Endemik Bitkilere Örnekler. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 30(1): 219-240.

Bar-Oz B, Preminger A, Pleg O, Block C, Arad I, 2001. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. Acta Paediatrica, 90(3): 356-8.

Baytop T 1984. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present). Nobel Tıp Kitabevleri, Istanbul

Chamberlain DF 1978. *Anchusa* L. In:Flora of Turkey and The East Aegean Islands (Davis PH., ed.). Edinburgh University Press, Edinburgh pp. 388 – 402

Costa ACD, Santos BHCD, Santos F, L., Lima EDO 2009. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. Rev. Brasilia Farma, 19(1B):236-41.

Coşkunçelebi K, Gültepe M. 2012. *Tragopogon* L. In: Güner A, editor. A checklist of the flora of Turkey (Vascular Plants). Istanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını; p. 211–212.).

Dafni A, Yaniv Z, and Palevitch D. 1984. Ethnobo-tanical survey of medicinal-plants in Northern Israel. J. Ethnopharmacol. 10, 295 – 310.

Demir H 2006. Erzurum'da Yetişen Madımak, Yemlik ve Kızamık Bitkilerinin Bazı Kimyasal Bileşimi. *Bahçe*, 35(1-2): 55-60

Doğan Y, Başlar S, Ay G, Mert HH 2004. The use of wild edible plants in western and central Anatolia (Turkey). Economic Botany, 58(4): 684–90.

El Beyrouthy M, Arnold N, Delelis-Dusollier A, and Dupont F 2009. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. Journal Ethnopharmacol. 120:315–334.

Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 11(1): 52-67.

Farzaei MH, Rahimi R, Attar F, Siavoshi F, Saniee P, Hajimahmoodi M, Mirnezami T, Khanavi M 2014. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oil and Extracts of *Tragopogon graminifolius*, a Medicinal Herb from Iran. Natural product communications, 9:121-4.

Khan R, Islam, B, Akram, M, Shakil, S, Ahmad AA, Ali, SM, Khan 2009. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules, 14(2):586-97

Korkmaz M, Karakurt E 2015. An ethnobotanical investigation to determine plants used as folk medicine in Kelkit (Gümüşhane/Turkey) district. Biological Diversity and Conservation, 8(3):290-303

Lin WP, Wang JT, Chang SC, Chang FY, Fung CP, Chuang YC, Chen YS, Shiau YR, Tan MC, Wang HY, Lai JF, Huang IW, Lauderdale TL 2016. The Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* from Community Settings in Taiwan, a Trend Analysis.Scientific R*eports*, 6:36280.

Matthews VA. 1975. *Tragopogon* L. In: Davis PH, editor. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. vol 5. Edinburgh: Edinburgh University Press; p. 657–668. ),

Murray PR, Baron EJ, Pfalle MA, Tenover FC, Yolke RH 1995. Manual of clinical microbiology. 6th edition, ASM Press, Washington, DC.

Özbucak TB, Akçin EA, Yalçın S 2007. Nutrition contents of the some wild edible plants in Central Black Sea Region of Turkey. International Journal of Natural and Engineering Sciences, 1: 11–13.

Özhatay N, Kültür Ş, Aslan S 2009. Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey IV. Turk Journal Botany, 33: 191-226.

Prasad MP 2014. Antimicrobial potential of *Brassicaceae* family against clinical isolates. International Journal of Pure and Applied Bioscience, 2(2):158-162.

Siyamoğlu B 1984. Ege Bölgesinde İnsan Beslenmesinde Kullanılan Bazı YabaniOtlar (Silcan, Karakan, Pirzola Kekiğ ive Kudret Narı) üzerinde Araştırmalar. EgeÜniversitesi Ziraat FakültesiDergisi, 21 (3): 75–88.

Şekeroğlu N, Özkutlu F, Deveci M, Dede Ö, Yılmaz N 2005. Ordu ve yöresinde sebze olarak tüketilen bazı yabani bitkilerin besin değeri yönünden incelenmesi. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5–9 Eylül 2005, Cilt I, 523–528, Antalya

Ugur A, Sarac N, Ceylan O, Duru ME, Okmen G, Varol O. 2009. Chemical composition of endemic *Tragopogon oligolepis* and studies on the antimicrobial activity against multi-antibiotic resistant bacteria. In International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants – SIPAM. ISHS Acta Horticulturae, 853, 299-306.

Yücel E, Şengün İ, Çoban Z 2012. Afyonkarahisar Çevresinde Gıda Olarak TüketilenYabani Otlar ve Tüketim Biçimleri. Biological Diversity and Conservation, 5 (2): 95-105

Yücel E, Güney F, Şengün İY 2010. The wild plants consumed as a food in Mihalıççık district (Eskisehir/Turkey) and consumption forms of these plants. Biological Diversity and Conservation, 3 (3): 158–175.

# Köpeklerde Sol Ventrikül Segmenter Duvar Hareket Bozukluğunun Ekokardiyografi İle Değerlendirilmesi

İriadam, Mehmet1., Toker, Melahat 2.

1 Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Eyyübiye Yerleşkesi, Eyyübiye-Şanlıurfa. Gsm: 0506 595 52 14, miriadam@harran.edu.tr.

2Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Kliniği. Ankara.

Gsm: melahattoker1410@hotmail.com

**Özet**

Kalp yetersizliği sendromu miyokard, perikard, endokard veya büyük damarları ilgilendiren herhangi bir patolojiden kaynaklanabilir. Çalışmamızda köpeklerde yapılan transtorasik ekokardiyografi ile sol ventrikül duvar kalınlıkları, boşluk boyutları ve kalp kapakları normaldi. Bütün köpeklere M mode, iki boyutlu, Renkli Doppler ekokardiyografi yapıldı. Çalışmamızda yaşlanma sürecinde diyastolik fonksiyonların belirgin olarak değiştiğini ve ekokardiyografide EF'si daha düşük bulunan hastalarımızda belirgin segmenter duvar hareket bozukluğuna rastlanıldı.

Bu çalışmanın amacı; Köpeklerde elde ettiğimiz bulgular, diğer hayvanlarda yapılacak , ekokardiyografide sol ventrikül segmenter duvar hareket bozukluğu çalışmalarına katkı sağlayacağı kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelime;** ekokardiyografi, köpek, segmenter bozukluk

## Evaluation of Left Ventricular Segmental Wall Movement Disorder in Dogs By Echocardıography

**Summary**

Heart failure syndrome can be caused by any pathology involving the myocardial, pericardium, endocardium, or large vessels. In this study, left ventricular wall thickness, cavity size and heart valves were normal with transthoracic echocardiography performed in dogs. M mode, two-dimensional, color Doppler echocardiography was performed on all dogs. In our study, significant changes in diastolic functions during the aging process and significant segmental wall movement disorder were observed in patients with lower EF in echocardiography.

The aim of this study was to conclude that the findings we obtained in dogs and other animals will contribute to the study of left ventricular segmental wall movement disorder in echocardiography.

**Key words**; echocardiography, dog, segmental disorder

## GİRİŞ

Son yıllarda ekokardiyografi alanında yapılan yeniliklerle beraber global ve bölgesel miyokard fonksiyonlarını değerlendirmek mümkün hale gelmiştir. Koroner arter hastalığı tüm dünyada en önemli ölümnedenlerinden birisidir. Koroner arter hastalığının tanısında kullanılan yöntemlerden birisi de hayvanlarda da ekokardiyografi olmaktadır. Koroner arter hastalığı varlığında veya şüphesinde duvar hareket bozukluklarının kantifiye edilmesi oldukça önemlidir (1,2). Sol ventrikül kasılmasını değerlendirirken günümüzde klasik 16 segment değerlendirmesi yerine 17 segment yaklaşımımı kullanılmaktadır. Kalbin bazal segmentleri Amerikan Ekokardiyografi Derneğinin önerisine göre 17 segment üzerinden skorlanmıştır (3).

Parasternal uzun eksen, parasternal kısa eksen ve apikal görüntülerinden M mode ve iki boyutlu ekokardiyografi tekniğiyle, normal, hiperdinamik, hipokinezi, akinezi, diskenizi ve anevrizma değerlendirildi.

Bu yeni segmenter yaklaşım modelinde sadece 'gerçek apeks' eklenmekle kalmamış, bazı segmentlerin ismi de değiştirilmiş, posteriyor segment sınıflamadan çıkartırılmıştır. Bölgesel duvar hareket bozukluklarını genel olarak görsel bir değerlendirme sonucunda normal, hipokinetik, akinetik veya diskinetik olarak, her bir segmentin duvar hareket skoru hesaplanarak değerlendirilebilen segmentlerin sayısını da göz önüne alarak global bir skor elde edebiliriz.

Miyokardın hareketlerinin Skorlanmasında; Normal /Hiperkinezi 1, Hipokinezi 2, Akinezi 3, Diskinezi 4 ve Anevrizma 5 olarak kabul edildi.

Normal bir kalp varlığında skor 1 iken ventrikül disfonskiyonun derecesi arttıkça skor rakamsal olarak artar (1,3). Yıllardır bu yöntemlerin pek çok kısıtlılıkları olduğu bilinmektedir. Bu yöntemlerde klasik olarak 'eye ball'değerlendirme

yani 'bak ve kabaca karar ver' yöntemi kullanılmaktadır. Fakat görsel değerlendirmenin pek çok kısıtlılıkları vardır. İnsan gözü grinin sadece birkaç tonunu ayırt edebilirken rengin binlerce tonunu ayırt edebilir (4,5,6).

Ekokardiyografik değerlendirme sırasında iskemik dokunun ayırt edilmesi açısından renk kullanıbilir fakat en ideal yöntem iskemik bölgeyle ilgili bazı sayısal değerleri direkt olarak elde edebileceğimiz yöntemlerin kullanılmasıdır. Bölgesel kasılmanın değerlendirilmesinde sayısalsonuçlar verebilen yöntemlerden en klasiği ve en önce kullanıma gireni doku Doppler ekokardiyografi'dir (7,8,9).

"Pulsed" Doppler ve renkli Doppler yöntemleri ile ventriküllerin global ve bölgesel fonksiyonları hakkında değerlendirme yapmamız, iskemik bölgeleri daha kolay ve daha net bir şeklide göstermemiz mümkündür (9,10,11).

## MATERYAL VE METOD

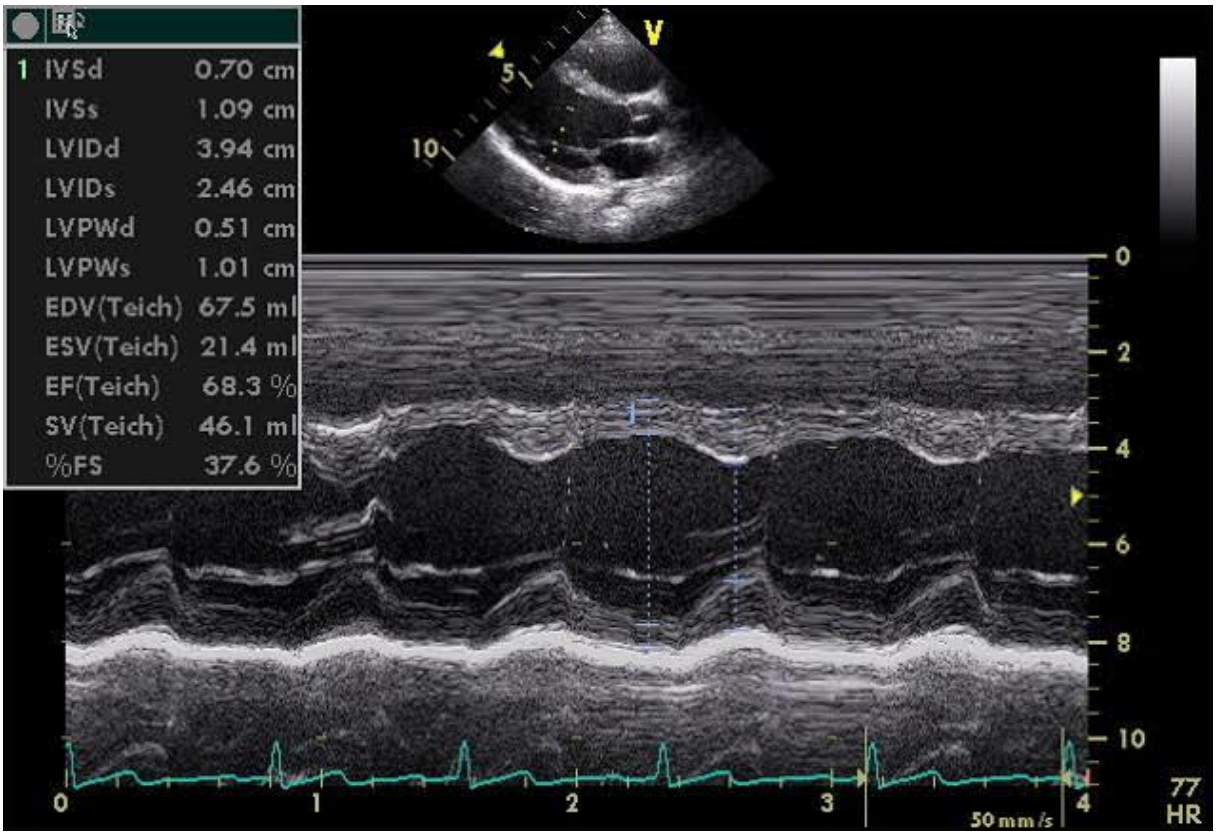
Çalışma; yaşları 8 ile 18 ara18 arasında değişen (15 erkek ve 10 dişi), 25 segmenter duvar hareket bozukluğu olan köpekler üzerinde yapıldı. Köpeklerden 19 tanesi büyük (25-35 kg) ve 7 tanesi de (7-15 kg) değişen hayvanlarda incelendi. Hayvanlar hasta sahiplerinin yardımıyla hikaye ve fizik muayenelerinin ardından biyokimyasal tetkikleri, EKG ve telekardiyografileri yapıldı. Hastalara transtorasik ekokardiyografi yapıldı. İstirahat halinde 12 derivasyonlu EKG çekildi. Transtorasik ekokardiyografide sol ventrikül sistolik disfonksiyonu olan (ejeksiyon fraksiyonu<%40) hastalar çalışmaya dahil edildi. Transtorasik Renkli Doppler ekokardiyografi cihazı, GE Vingmed ultrasonografi ile her hastaya bakıldı.. Ekokardiyografi ile diyastol sonu çapı, sistol sonu çapı, septum-arka duvar kalınlığı, aort kapak çapı, sağ boşluk boyutları ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ölçüldü.Bütün kapakların (mıtral,aort,triküspit, pulmoner) yapısı, yetmezlikleri, gradientlerine de bakıldı. Kalbin bazal segmentleri Amerikan Ekokardiyografi Derneğinin önerisine göre 17 segment üzerinden skorlanmıştır. Parasternal uzun eksen, parasternal kısa eksen ve apikal görüntülerinden normal, hiperdinamik, hipokinezi, akinezi, diskenizi ve anevrizma değerlendirildi (3,13)

## BULGULAR

İskemik kalp hastalığı en sık mortalite nedeni olup ölümlerin %30'undan sorumludur. En sık görülen semptomlar miyokard infarktüsü, unstabil anjina ve kalp yetersizliğidir. Köpeklerde erkek cinsi, hipertansiyon, ileri yaş, hiperlipidemi iskemik kalp hastalığını artıran neden olarak değerlendirildi. Global ve bölgesel ventriküler fonksiyonlar, endokard ve duvar kalınlıklarına bakılarak değerlendirildi.

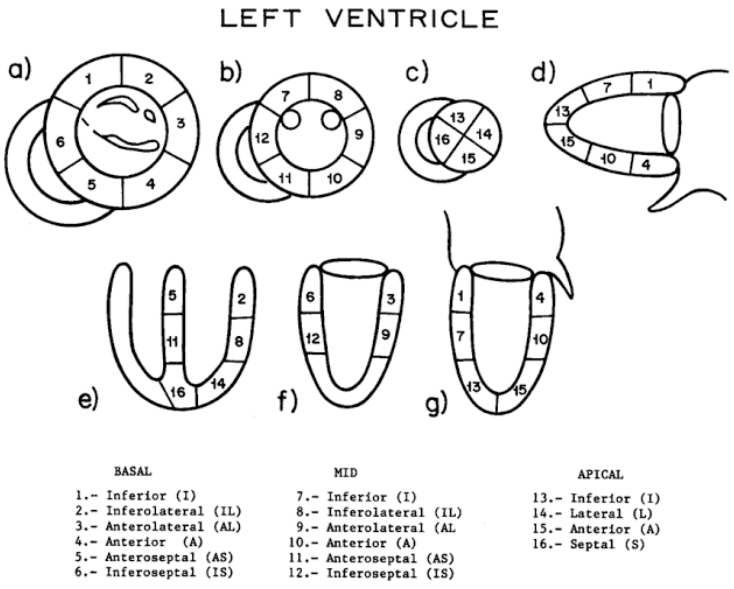
Global ventriküler sistolik fonksiyonun en iyi göstergesi ejeksiyon fraksiyon (EF) çalışmamıza büyük katkı sağladı (9,14. Normal sol ventrikül EF'si %55 ve üzerindeyken hastalarımızda %55'ın altında ölçümler alındı. Stroke volüm (SV), cardiak output(CO) ve sol ventrikül sistolik basıncının yükselme hızı (dP/dt) da eko ve Doppler tekniklerinden yararlanarak ölçüldü (4,5). EF: %40-49 arasında olanları ılımlı, EF%30-39 arasında olanları orta, EF%30'un altında olanları ciddi disfonksiyon olarak değerlendirildi (14,15,17).

EF % olarak parasternal kısa eksenden, parasternal uzun eksenden ve apikal görüntülerden görsel değerlendiridi. İki boyutlu ekokardiyografide, parasternal uzun eksen görüntüsünden M mode ekokardiyografi Teichholz formülü ile diyastol sonu ve sistol sonu volümlerinin hesabıyla EF% olarak elde edildi (4). Şekil 1' de EF'nin M mode ölçümünün nasıl yapıldığı gösterilmiştir.




***Şekil 1. M. Mode ve İki Boyutlu ekokardiyografide EF ölçümü***

Çalışmamızda; 25 tane köpeğin 10'unda değişik segmentlerde duvar hareket bozukluğu tesbit edilirken (anterior, posterior, inferior,septum, apeks, inferiolateral), 5 hastada apikal diskinezi ile anterioseptal hipokinezi, 3 hastada akinetik alanlar ve diğer 5 hastada ileri derecede kalp yetmezliği ile global hipokinezi izlendi. Şekil 2. Köpeklerin çoğunda sistolik fonksiyon bozukuğu ile birlikte diyastolik fonksiyon bozukluğu saptandı.

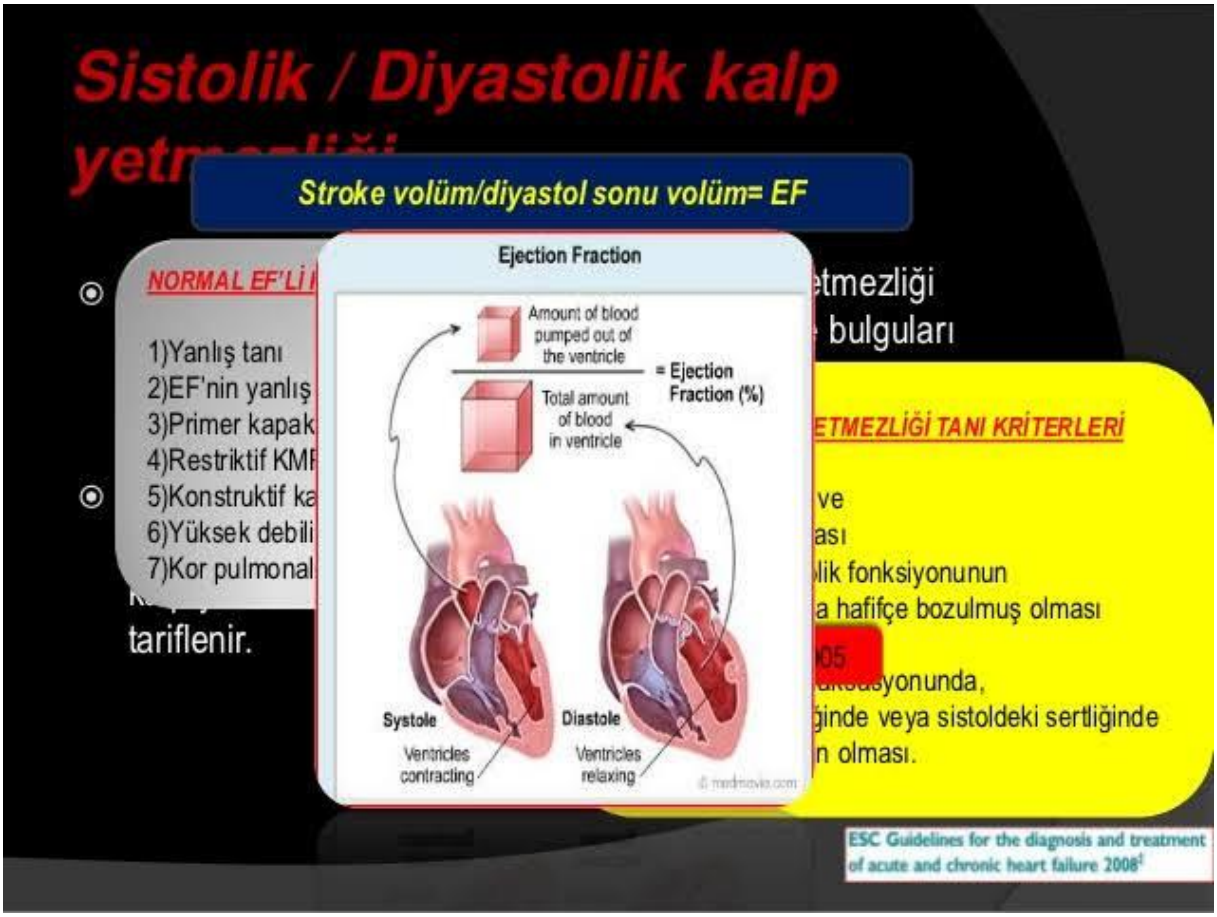



***Şekil 2. İki Boyutlu Ekokardiyografide Sol Ventrikül Segmenter duvar hareket bozukluğu.***

**TARTIŞMA VE SONUÇ**

Kardiyak hastalıkların progresyonunun ve/veya tedaviye verilen cevabın değerlendirilmesi açısından sol ventrikül volüm ve fonksiyonlarının doğru biçimde ölçülmesi çok önemlidir (3,4). Bu amaçla kullanılacak tetkik yönteminin; non-invazif olması, global ve bölgesel fonksiyon bozukluklarındaki küçük değişiklikleri hassas ve doğru bir şekilde saptaması, yöntemin doğruluk ve tekrar edilebilirlik değerlerinin yüksek olması gerekmektedir. Ekokardiyografi; kardiyak morfoloji ve fonksiyonların tespitinde yaygın olarak kullanılan, ucuz, noninvazif bir yöntemdir. Bütün köpeklere M mode, iki boyutlu, Renkli Doppler ekokardiyografi yapıldı. Çalışmamızda yaşlanma sürecinde diyastolik fonksiyonların belirgin olarak değiştiğini ve ekokardiyografide EF'si daha düşük bulunan hastalarımızda belirgin segmenter duvar hareket bozukluğu, semptomlar, miyokard infarktüsü, unstabil anjina ve kalp yetersizliği izlendi. Köpeklerde erkek cinsi, hipertansiyon, ileri yaş, hiperlipidemi iskemik kalp hastalığını artıran neden olarak değerlendirildi. Global ve bölgesel ventriküler fonksiyonlar endokard ve duvar kalınlıklarına bakılarak değerlendirildi (8,16,17).

Global ventriküler sistolik fonksiyonun en iyi göstergesi ejeksiyon fraksiyon (EF) çalışmamıza büyük katkı sağladı (Şekil 3).




***Şekil 3. Sistolik /Diastolik kalp yetmezliği. EF= Stroke Volüm/Diyastol sonu volüm.***

Normal sol ventrikül EF'si %55 ve üzerindeyken hastalarımızda %55'ın altında ölçümler alındı. Stroke volüm (SV), cardiak output (CO) ve sol ventrikül sistolik basıncının yükselme hızı (dP/dt) da eko ve Doppler tekniklerinden yararlanarak ölçüldü. EF: %40-49 arasında olanları ılımlı, EF%30-39 arasında olanları orta, EF%30'un altında olanları ciddi disfonksiyon olarak değerlendirildi. 25 hastanın 10'unda değişik segmentlerde duvar hareket bozukluğu tesbit edilirken (anterior, posterior, ınferior,septum , apeks, inferiolateral), 5 hastada apikal diskinezi ile anterıoseptal hipokinezi, 3 hastada akinetik alanlar ve diğer 5 hastada ileri derecede kalp yetmezliği ile global hipokinezi izlendi.Köpeklerin çoğunda diyastolik fonksiyon bozukluğuda saptandı.

Sonuç olarak; Sol ventrikül fonksiyonlarının değerlendirilmesinde yaygın bulunabilirliği ve ucuz maliyet oranlarıyla pratikte ekokardiyografi tercih edilen yöntem diyebiliriz.

Bütün köpeklere M mode, iki boyutlu, Renkli Doppler ekokardiyografi yapıldı. Çalışmamızda yaşlanma sürecinde diyastolik fonksiyonların belirgin olarak değiştiğini ve ekokardiyografide EF'si daha düşük bulunan hastalarımızda belirgin segmenter duvar hareket bozukluğuna rastlanıldı.

daha düşük bulunan hastalarımızda belirgin segmenter duvar hareket bozukluğuna rastlanıldı. Köpeklerde elde ettiğimiz bulgular, diğer hayvanlarda yapılacak , ekokardiyografide sol ventrikül segmenter duvar hareket bozukluğu çalışmalarına katkı sağlayacağı kanısına varılmıştır.

**TEŞEKKÜR**

Hayvansever lerimize ve hasta yakınlarına, manevi yönünden destek veren arkadaşlarımıza teşekkür ederiz.

**KAYNAKLAR;**

1.Aytan Y, Koşar F. Kollateral dolaşım. MN Kardiyoloji 2000; 7:64-70

2. Tandoğan I, Altınok T, Aslan H ve ark. Koroner Arter Hastalığında Kollateral Dolaşım Varlığının Sol Ventrikül Fonksiyonları Üzerine Etkisi Olabilir mi? Anadolu Kardiyol Derg 2002;2: 91-5

3. Fujii J, Watanabe T, Takahashi N, Ohta A, Kato K: Echocardiographic and cross-sectional echocardiography study of the left ventricular wall nıotions in complete left bundle branch block. Jpn Circ J 1 976;43:

4. Saim DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A: Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation 1978;58: 1072-83

5. Weissler AM, O'neill WW, Sohn YH, Stack RS, Chew PC, Reed AH: Prognostic significance of

systolic time inıervals after recovery from nıyocardial infarction. Am J Cardiol 198;48: 995-1002

6. Waiaright RJ, Maisey MN, Edwards AC ve ark. Functional significance of coronary collateral circulation during dynamic exercise evaluated by thallium-201 myocardial scintigraphy. Br Heart J 1980; 43: 47-55 7. Werner GS, Richartz BM, Gastmann O

7. Saim DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A: Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measuenıen s. Circulation 1978;58: 1072-83

8. Werner GS, Richartz BM, Gastmann O ve ark. Figulla HR. Immediate changes of collateral function after successful recanalization of chronic total coronary occlusions. Circulation 2000; 102: 2959-65

9. Carroll RJ, Verani MS, Falsetti HL The effect of collateral circulation on segmental left ventricular contraction. Circulation 1974; 50: 709-813

10. Weintraub WS, Hattori S, Agarwal JB ve ark. The effects of nifedipine on myocardial blood flow and contraction during ischemia in the dog.Circulation 1982; 65: 49-53

11. Bloor CM Functional significance of the coronary collateral circulation. A review. Am J Pathol 1974; 76: 561-88

12. Lee CW, Park SW, Cho GY ve ark. Pressurederived fractional collateral blood flow: a primary determinant of left ventricular recovery after reperfused acute myocardial infarction.J Am Coll Cardiol 2000; 35: 949-55

13. Dağdelen S, Eren N, Karabulut H ve ark. Sol ventrikül hipertrofisi ile diyastolik fonksiyonları arasındaki ilişkinin yeni ekokardiyografik yaklaşımlarla değerlendirilmesi Türk Kardiyol Dern Arş 2001; 29: 173-80

14. Cicala S, Galderisi M, Caso P ve ark. Right ventricular diastolic dysfunction in arterial systemic hypertensiom: analysis by pulsed tissue Doppler. Eur J Echocardiogra 2002; 3:135-42

15. Vinereanu D,Khokhar A, Fraser AG. Reproducibility of pulsed wave tissue Doppler echocardiography. J Am Soc Echocardiogr 1999;12: 492-9.

16. Nagueh SF, Middleton KJ, Kopelen HA ve ark. Doppler tissue imaging: a noninvasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. J Am Coll Cardiol 1997 30:1527-33.

17. Garcia- Fernandez MA, Azevedo J, Moreno M ve ark. Regional diastolik function in ischaemic heart disease using pulsed wave Doppler tissue imaging. Eur Heart J 1999; 20:496-505

# Investigation of mobile phone usage behaviors of students according to education status

Mehmet Cihan YAVAŞ

Kırşehir Ahi Evran University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Kırşehir, Turkey

mcihanyavas@ahievran.edu.tr

**Abstract**

The aim of this study is to determine the behaviors and approaches of students of different educational level using mobile phones. A total of 1000 students (secondary school 250, high school 250, associate degree 250 and bachelor degree 250) were included in this study. A questionnaire consisting of 23 questions was used to question the relationship between the level of education of the students and their use of mobile phones. The mean age of the students included in the study was 17.97±0.68, 41.5% were boys and 58.5% were girls. 93.3% of the students stated that they used mobile phones (p=0.000), 82.7% stated that mobile phones were harmful, 62.7% stated that mobile phones caused brain tumors (p=0.153). While 90.3% of the students could not ask for Specific absorption rate (SAR) value (p=0.034), 66 % of them stated that they used the phone adhered to their ear and carried it in their pocket (p=0.000). As the biological effects of mobile phones were not known by the students, it was noticed that the usage behaviors were not correct. It is seen that the SAR value generated by mobile phones is important during the purchase of mobile phones and to a large extent students and adolescents do not pay attention to this.

**Keywords:** Cell phone, Students, Behavior, Harmful effects, SAR

## INTRODUCTION

With the development of technology, mobile phone usage rate is increasing rapidly all over the world. With the increasing use of this mobile phone, there are also concerns about potential health problems due to exposure to the radiofrequency (RF) field. The use and interaction of mobile phones among young people is higher for different reasons. Since RF exposure differs in the degree of absorption of brain tissue in children and adults, it is more likely to be affected, especially in children (Wiart et al., 2011). Negative reports on public health are published. There is a risk that young people and children are exposed to, and in close contact with, electromagnetic field exposures at this time (Geronikoluu et al., 2015). In recent years, technological advances in mobile phones have been forming new generations (from 2G to 5G). Recent epidemiological studies indicate that children reach more phones and the age of use decreases. Because of these concerns and risks, the World Health Organization (WHO) has given higher priority to research on radiofrequency effects of children (Langer et al., 2017). As a result, students can use their mobile phones, tablets and wireless applications in schools and universities not only in their free time but also all day. The impact of technology on student performance and the potential effects of excessive smartphone use are noteworthy Felisoni and Godoi, 2018). In recent years of children (for example: smartphone, tablet) considerably excessive and frequent use concerns about the impact on children's health and well-being. Studies have reported reports on the effect of mobile device use on sleep outcomes, physical activity and obesity, musculoskeletal pain, neurological symptoms, headache, eye and ear health (Domoff et al., 2019).

The aim of this study is to evaluate the effects and usage behaviors of children and students all over the world that are likely to be able to access and constantly interact with mobile phones. The aim of this study was to determine the attitudes and behaviors of students with different levels of education.

## MATERIALS AND METHODS

Our study is a cross-sectional study which is an analytical research. Our study consisted of 250 students from each group of randomly selected middle school, high school, associate and undergraduate students in Kırşehir - Turkey. Total number of samples was accepted as n: 1000. Informed consent forms were filled out for students under the age of 18 and older, regardless of age and sex, and the study was started after obtaining their consent. Necessary permissions were obtained from the Ministry and Provincial Directorate of National Education for secondary and high school students (E-17679370 number, 27/09/2018), in order to start working with university students, permissions were obtained from the university administration (E-93011 number, 11.09.2018). Then, after obtaining the ethical permission of the Faculty of Medicine, the study was started (09/10/2018-18/153). Completion time of our questionnaire, which has 23 questions, was 5 minutes. The study

continued for 3 months. No exclusion factor was used in the study. At the end of the study, the data were collected and analyzed.

**Data analysis**

IBM SPSS 21.0 Windows statistical package program was used for statistical evaluation of our research data. Measured variables were presented as mean ± standard deviation (SD), and categorical variables were presented by number and percentage (%). Chi-square test was used to compare qualitative variables. For all statistical analyzes, $p \leq 0.05$ was found to be statistically significant.

## RESULTS

The total mean age of the students was 17.97 ± 0.68, 41.5 % were boys and 58.5 % were girls. The mean age of middle school students was 13.40 ± 0.72, of which 47.2 % were boys and 52.8 % were girls. The mean age of high school students was 16.31 ± 1.03, of which 37.6 % were boys and 62.4 % were girls. The average age of associate students is 20.49 ± 0.49, of which 42 % are boys and 58 % are girls. The average age of undergraduate students was 21.71 ± 0.48, of which 39.2 % were male and 58.5 % were female. Min, max and median values of all groups are given in Table 1

**Table 1.** Some demographic characteristics of students with different education

| Students | Frequency (n) | Age | | | | Gender | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Mean±SD | Min | Max | Median | Male (n, %) | Female (n, %) |
| Middle School | 250 | 13,40±0,72 | 11 | 15 | 14 | 118 (47,2 %) | 132 (52,8 %) |
| High School | 250 | 16,31±1,03 | 14 | 18 | 16 | 94 (37,6 %) | 156 (62,4 %) |
| Associate Degree | 250 | 20,49±0,49 | 18 | 38 | 20 | 105 (42 %) | 145 (58 %) |
| Undergraduate | 250 | 21,71±0,48 | 18 | 36 | 21,5 | 98 (39,2 %) | 152 (60,8 %) |
| Total | 1000 | 17,97±0,68 | | | | 415 (41,5 %) | 585 (58,5 %) |

Data are presented as mean±standard deviation, minimum, maximum, median, n and %

Do you use a mobile phone? Looking at the situation, it was stated that 933 students used and 67 students did not. With the increase in education level, the rate of mobile phone use also increased (p: 0.000). When using the mobile phone, it was found out that the students used 430 and 570 did not use the headphones (p: 0.000). Among the participants, 827 students (p: 0.000) stated that mobile phones were harmful to human health and 627 students (p: 0.153) stated that mobile phones might have caused brain tumors. Most of the students in the whole group are aware of the harmful effects of mobile phones. It was found that 905 students did not ask for SAR value when buying a mobile phone (p: 0.034). It has been observed that with the increase in the educational level, the response to the SAR is partly increased. The higher the education level, the higher the rate of using the mobile phone as a modem. (P = 0.000). It was determined that there were 392 students who stated that he had cell phone addiction, and this rate was higher in associate and undergraduate students (p: 0.000). It was determined that the awareness of mobile phone addiction treatment centers was partially present in all groups (p: 0.009). Questionnaires are presented in Table 2.

**Table 2:** Number and percentage of yes-no answers given by participants according to mobile phone usage

| Total (n) | | Middle School (n,%) | | High School (n,%) | | Associate Degree (n,%) | | Undergraduate (n,%) | | p-value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Yes | No | Yes | No | Yes | No | Yes | No | Yes | No | $\chi^2$ |
| Do you use a mobile phone? | | | | | | | | | | |
| 933 | 67 | 193 (79) | 53 (21) | 238 (95) | 12 (5) | 248 (99) | 2 (1) | 250 (100) | 0 | 0,000* |
| Do you use headphones? | | | | | | | | | | |
| 430 | 570 | 69 (28) | 181 (72) | 92 (37) | 158 (63) | 136 (54) | 114 (46) | 133 (53) | 117 (47) | 0,000* |
| Is it harmful to human health? | | | | | | | | | | |
| 827 | 173 | 209 (84) | 41 (16) | 184 (74) | 66 (26) | 211 (84) | 39 (16) | 223 (89) | 27 (11) | 0,000* |
| Do cell phones do brain tumors? | | | | | | | | | | |
| 672 | 329 | 155 (62) | 95 (38) | 165 (66) | 85 (34) | 176 (70) | 74 (30) | 175 (70) | 75 (30) | 0,153 |
| Did you ask for SAR value when buying a mobile phone? | | | | | | | | | | |
| 95 | 905 | 12 (5) | 238 (95) | 27 (11) | 223 (89) | 29 (12) | 221 (88) | 27 (11) | 223 (89) | 0,034* |
| Do you use your mobile phone as a modem? | | | | | | | | | | |
| 521 | 479 | 104 (42) | 146 (58) | 126 (50) | 124 (50) | 141 (56) | 109 (44) | 150 (60) | 100 (40) | 0,000* |
| Do you think you're a cell phone addict? | | | | | | | | | | |
| 392 | 608 | 42 (19) | 202 (81) | 85 (34) | 165 (66) | 132 (53) | 118 (47) | 127 (51) | 123 (49) | 0,000* |
| Are you aware that there are cell phone addict treatment centers? | | | | | | | | | | |
| 370 | 630 | 107 (43) | 143 (57) | 101 (40) | 149 (60) | 89 (36) | 161 (64) | 73 (29) | 177 (71) | 0,009* |

*p value <0.05 was defined as statistically significant.
Data were presented as numbers and percentages.

A total of 5 to 30 minutes of daily mobile phone calls were intensified (p: 0,000), which was left by 294 students at night and 122 students left their mobile phones under their pillows. As the level of education increased, the students left their mobile phones next to their heads and under their pillows and this rate increased (p: 0.000). It was found that 869 students were talking to the right ear by telephone (p: 0.384), the

SAR value of the phone was not known by 981 students (p: 0.367), and 981 students did not answer the SAR limit value (p: 0.027). 919 of the students stated that they have smart phones and the rate of having smart phones increased as the level of education increased (p: 0.000). It is seen that mobile phone use is widespread at middle school level (p: 0,000). The average number of students who spoke 5-10 minutes in a phone call was 409 (p: 0,000). 669 students using mobile phones adhered to the ear and increased the educational status of this rate was determined to increase (p: 0,000). In all groups, the use of mobile phones such as speech, internet, games and social media was close (p: 0,000) and all students had a single phone (p: 0,000). In addition, 665 of the students stated that they carried their cell phones in their pockets, 160 of them in their hands and 155 in their bags (p: 0.000). It was found that carrying the phone in the pocket was higher in undergraduate students and carrying it in the bag was higher in secondary school students. Questionnaires are presented in Table 3a and 3b.

**Table 3a:** Number and percentage of answers given by participants according to mobile phone usage

| | Total (n) | Middle School | High School | Associate Degree | Undergraduate (n,%) | p |
|---|---|---|---|---|---|---|
| How many minutes do you speak each day? (n,%) | | | | | | |
| Less than 5 min | 212 | 118 (47) | 67 (27) | 12 (5) | 15 (6) | 0,000* |
| 5-10 min | 252 | 76 (31) | 83 (33) | 52 (21) | 41 (16) | |
| 10-30 min | 223 | 38 (15) | 48 (19) | 62 (25) | 75 (30) | |
| 30 min -1 hour | 132 | 10 (4) | 28 (11) | 49 (19) | 45 (18) | |
| +1 hour | 181 | 8 (3) | 24 (10) | 75 (30) | 74 (30) | |
| Where's your cell phone while you sleep at night? | | | | | | |
| On my head | 294 | 19 (8) | 58 (23) | 108 (43) | 109 (44) | 0,000* |
| under my pillow | 122 | 8 (3) | 37 (15) | 37 (15) | 40 (16) | |
| 1 m away | 155 | 43 (17) | 50 (20) | 28 (11) | 34 (14) | |
| in charge | 267 | 63 (25) | 69 (28) | 73 (29) | 62 (25) | |
| In another room | 162 | 117 (47) | 36 (14 | 4 (2) | 5 (2) | |
| Which ear are you talking to with your cell phone? | | | | | | |
| Right ear | 869 | 219 (88) | 214 (86) | 224 (90) | 212 (85) | 0,384 |
| Left ear | 131 | 31 (12) | 36 (14) | 26 (10) | 38 (15) | |
| What is the SAR value of the mobile phone you are using? | | | | | | |
| I know | 19 | 2 (1) | 6 (2) | 7 (3) | 4 (2) | 0,367 |
| I do not know | 981 | 248 (99) | 244 (98) | 243 (97) | 246 (98) | |
| What is the SAR limit value? | | | | | | |
| Responded | 19 | 2 (,8) | 5 (2) | 2 (,8) | 10 (4) | 0,027* |
| No reply | 981 | 248 (99) | 245 (98) | 248 (99) | 240 (96) | |
| Which mobile phone model are you using? | | | | | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| No phone | 37 | 33 (13) | 2 (,8) | 2 (,8) | 0 | 0,000* |
| Push-button | 44 | 26 (10) | 13 (5) | 2 (,8) | 3 (1) | |
| Smart model | 919 | 191 (77) | 235 (94) | 246 (98) | 247 (99) | |
| How many years have you been using mobile phones? | | | | | | |
| 0 years | 37 | 35 (14) | 2 (,8) | 15 (6) | 0 | 0,000* |
| 1 years | 138 | 80 (32) | 36 (14) | 11 (4) | 7 (3) | |
| 2 years | 203 | 86 (34) | 96 (39) | 137 (55) | 10 (4) | |
| 5 years | 398 | 47 (19) | 108 (43) | 61 (25) | 106 (42) | |
| 10 years | 143 | 2 (1) | 5 (2) | 26 (10) | 75 (30) | |
| +10 years | 81 | 0 | 3 (1) | 0 | 52 (21) | |
| Your interview time in a conversation? | | | | | | |
| 1-5 minute | 371 | 162 (65) | 112 (45) | 57 (23) | 40 (16) | 0,000* |
| 5-10 minute | 409 | 77 (31) | 90 (36) | 111 (44) | 131 (52) | |
| +10 minute | 220 | 11 (4) | 48 (19) | 82 (33) | 79 (32) | |
| What is the distance to your ear when using a mobile phone? | | | | | | |
| Conjoined to the ear | 669 | 133 (53) | 155 (62) | 189 (76) | 192 (77) | 0,000* |
| 1 cm away | 251 | 85 (34) | 75 (30) | 53 (21) | 38 (15) | |
| 2 cm away | 80 | 32 (13) | 20 (8) | 8 (3) | 20 (8) | |

*p value <0.05 was defined as statistically significant. Data were presented as numbers and percentages

**Table 3b:** Number and percentage of answers given by participants according to mobile phone usage

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| The purpose of using a mobile phone? | | | | | | |
| Phone call | 295 | 94 (38) | 75 (30) | 95 (38) | 62 (25) | 0,000* |
| Game | 76 | 22 (9) | 24(10) | 8 (3) | 6 (3) | |
| Social | 129 | 23 (9) | 30 (12) | 51 (20) | 57 (22) | |
| Internet | 158 | 56 (22) | 67 (27) | 35 (14) | 20 (8) | |
| All | 273 | 55 (22) | 52 (21) | 61 (24) | 105 (42) | |
| Number of mobile phones you use? | | | | | | |
| 0 items | 32 | 30 (12) | 2 (,8) | 0 | 0 | 0,000* |
| 1 piece | 907 | 209 (84) | 231 (92) | 226 (90) | 241 (96) | |
| 2 pieces | 43 | 10 (4) | 10 (4) | 18 (7) | 5 (2) | |
| 3 pieces | 18 | 1 (,4) | 7 (3) | 6 (3) | 4 (2) | |

| How do you carry your mobile phone? | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pocket | 665 | 154 (62) | 190 (76) | 151 (60) | 168 (67) | 0,000* |
| In your hand | 160 | 16 (6) | 33 (13) | 66 (27) | 45 (18) | |
| In handbags | 155 | 60 (24) | 25 (10) | 33 (13) | 37 (15) | |
| No phone | 20 | 20 (8) | 2 (,8) | 0 | 0 | |

*p value <0.05 was defined as statistically significant.
Data were presented as numbers and percentages.

## DISCUSSION

Parents have concerns and fears about the impact of these technologies on children. Clinicians state that certain limitations should be imposed on children to use these technologies and that children and these technologies should be discussed [6]. Recent national estimates indicate that 77% of children aged 12-17 have a mobile phone, and about a quarter of young people in this age group have a smartphone. Research has shown that young people interacting with smartphones can have a range of negative health problems and sexual content messages will reveal adolescent heresy [7]. Mobile phones had emerged as a means of communication for people. But with the availability of lots of options that can be accessed with mobile phones, it raises certain problems like self-regulation and dependence on people. Researchers have indicated that continuous interaction with mobile phones will lead to a decrease in academic performance [8]. In order to ensure a regular and productive classroom environment, instructors play a major role in preventing non-academic use of mobile phones in a classroom environment and in a classroom policy that students can follow [9]. In our study, it was seen that the age of mobile phone use decreased and the number of dependence increased with increasing education level. In our study, it was found out that they used mobile phones for internet, games, social media purposes and 91.9% of the students had smart phones.

Some researchers have stated that the use of mobile phones before going to bed can cause sleep disorders [10]. Researchers investigated the effects of mobile phone use on health problems in children aged 11-15 in Taiwan. They reported that long-term exposure to radiofrequency electromagnetic fields increases headache and skin itching [11]. A study was conducted to investigate the effect of mobile phone among medical students. At the end of the study, it was emphasized that the use of a limited number of mobile phones, low battery level, lack of signal caused unrest in the students, lack of concentration, sleep disturbance, connective pain, ear warming, short-term memory loss and brain tumors such hazards [12]. Researchers investigating the cell phone behavior of high school students, the age of starting to use the mobile phone and the use of headphones is low, does not have enough information about the base stations, high rate of mobile phones are harmful, 78% when they sleep next to the mobile phone or put under the pillow [13]. Alkış et al. studied cell phone exposures at different frequencies in the laboratory. They concluded that radiofrequency exposures lead to oxidative DNA damage and lipid peroxidation in brain tissue [14]. In our study, as the level of education increased, there was an increase in the rate that mobile phone was harmful to human health. It was seen that students need more information about the status of brain tumor formation in mobile phones. 90.5% of the students did not ask for SAR (Specific absorption rate) value in the purchase of mobile phones. 66.9% of the students used their cell phones while talking with their ears and this ratio increased proportionally with the increase in education level. 66.5% of the students carried mobile phones in their pockets, 16% in their hands and 15.5 % in their bags. The higher the level of education, the higher the use of headphones. When the findings were interpreted with the literature data, it was realized that the students needed more information.

## CONCLUSION

As a result, it was determined that the behaviors of the students who have different education levels have different behaviors. With the development of technology, all age groups and especially children are exposed to radiofrequency electromagnetic field-induced areas such as mobile phones. As children's brain tissue is not yet complete, neurological, movement-related disorders and other harmful biological influences are likely to spread. In our study, it was found that the rate of mobile phone use among the students was high and that the SAR values generated by the phones in case of having a phone did not ask and could not be informed about this issue. In addition, the fact that mobile phones have significant knowledge of brain tumors and that the majority of students indicate that mobile phones are harmful, may indicate an addictive effect.

Especially scientific circles, parents, school administrations have a big duty. For a healthier generation, it is essential that students spend less time on mobile phones and use them appropriately.

**Funding:** None.
**Conflicts of interest:** The author states that there is no conflict of interest.
**Author contributions:** The author has played an active role in all the processes from the beginning to the end of the study.

## REFERENCES

A Geronikolou S, Chamakou A, Mantzou A, Chrousos G, Gantenbein CK. 2015. Frequent cellular phone use modifies hypothalamiz-pituitary-adrenal axis response to a cellular phone call after mental stress in healthy children and adolescents: a pilot study. Sci Total Environ., 536:182-188.

Alkış ME, Bilgin HM, Akpolat V, Daşdağ S, Ekin K, Yavaş MC, et al. 2019. Effect of 900-, 1800-, and 2100-MHz radiofrequency radiation on DNA and oxidative stress in brain. Electromagn Biol Med., 38(1):32- 47.

CT Chiu, YH Chang, CC Chen, MC Ko, CY Li. 2015. Mobile phone use and health symptoms in children. J Formos Med Assoc., 114(7):598-604.

David P, Kim JH, Brickman JS, Ran W, & Curtis CM. 2015. Mobile phone distraction while studying. New Media & Society., 17(10):1661-1679.

Domoff SE, Borgen AL, Foley RP, Maffett A. 2019. Excessive use of mobile devices and children's physical health. Hum Behav & Emerg Tech., 1:169–175.

E. Langer C, de Llobet P, Dalmau A, Wiart J, Goedhart G, Hours M, et al. 2017. Patterns of cellular phone use among young people in 12 countries: Implications for RF exposure. Environ Int., 107:65-74.

Ergin A, Uzun SU, Bozkurt Aİ. 2014. High school students' usage behavior and views about mobile phones. Dicle Medical Journal., 41(3):542-547.

Exelmans L. and Bulck JV. 2016. Bedtime mobile phone use and sleep in adults. Social Science & Medicine., 148: 93-101.

Felisoni DD, and Godoi AS. 2018. Cell phone usage and academic performance: An experiment. Comput Educ., 117:175–187.

Gahlot A, Chaudhary P, Gahlot SK. 2016. Pattern of mobile phone use and its effect among medical students. J Evolution Med Dent Sci., 5(41):2624-2627.

Lancaster AL and Goodboy AK. 2015. An Experimental examination of students' attitudes toward classroom cell phone policies. Commun Res Rep., 32;(1):107-111.

JS Radesky, S Eisenberg, CJ Kistin, J Gross, G Block, B Zuckerman, M Silverstein. 2016. Overstimulated consumers or next-generation learners? Parent tensions about child mobile technology use. Ann Fam Med., 14:503-508.

SE Wolfe, CD Marcum, GE Higgins. ML Ricketts. 2016. Routine cell phone activity and exposure to sext messages: Extending the generality of routine activity theory and exploring the etiology of a risky teenage behavior. Crime & Delinquency., 62(5):614–644.

Wiart J, Hadjem A, Varsier N, Conil E. 2011. Numerical dosimetry dedicated to children RF exposure. Prog Biophys Mol Biol., 107:421–427.

# Dondurma üretiminde kullanılan maddeler ve fonksiyonel bir gıda olarak meyveli dondurma

Gizem Musaoğlu[1], Deren Tahmas-Kahyaoğlu[2*]

[1] Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı; Kastamonu, Türkiye.
[*2] Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü; Kastamonu, Türkiye.

*Sorumlu yazar e-mail: dtkahyaoglu@kastamonu.edu.tr

## Özet

Süt ve sütten elde edilen ürünler, canlılığın sürdürülebilmesi ve gelişimsel birtakım faaliyetlerin gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan; karbonhidrat, yağ, protein ve mineral maddeleri yapısında dengeli bir biçimde barındırması sebebiyle canlılar için önemli bir yere sahiptir. Dondurma, bir süt ürünü olarak kendine has lezzet ve aroması ile günümüzde her yaş grubundan insanın severek tükettiği kolay sindirilebilme özelliği taşıyan değerli bir gıdadır. Özellikle protein, kalsiyum, vitamin A, D ve riboflavin gibi maddeleri yapısında yüksek oranda ihtiva etmektedir. Ayrıca süte göre daha konsantre bir yapıda olup, besin değerinin sütten daha yüksek olmasıyla da ilgileri üzerine çekmektedir. Fakat günümüzde dondurmanın besin değerinin yüksekliğinin yanısıra bazı fenolik bileşenler, diyet lifi ve vitaminler bakımından yetersiz bileşime sahip olduğu tespit edilmiş ve bunun geliştirilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmasının uygun olduğu görüşüne varılmıştır. Son yıllarda sağlık üzerine olumlu etkileri olan gıdalara ilginin artış göstermesiyle birlikte dondurma endüstrisinde de yeni ürün geliştirme faaliyetleri hız kazanmış ve dondurmanın yetersiz kaldığı bu maddelerce zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple dondurmanın bileşimine; doğal antioksidan ve diyet lifleri bakımından zengin içeriği ile dikkat çeken meyvelerin ilavesi yapılmaya başlanmış ve sonuçta antioksidan özellik gösteren fonksiyonellik kazanmış yeni dondurmalar üretilmiştir. Fonksiyonel özellik gösteren meyveli dondurmalar, meyvelerden gelen doğal renk maddeleriyle hoş bir görünüm elde etmesinin yanında ayrıca yağ ve kolesterol içeriğinin düşük olması sebebiyle de birçok kişinin ilgi odağı olmuş ve her geçen gün aranan bir gıda olma özelliği kuvvetlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Dondurma, Meyveli dondurma, Fonksiyonel gıda

# Ingredients used in ice cream production and fruit ice cream as a functional food

## Abstract

Milk and dairy products are necessary for sustaining vitality and carrying out a number of developmental activities; carbohydrate, fat, protein and mineral substances in the structure in a balanced way because it has an important place for living things. Ice cream, as a dairy product with its unique flavor and aroma, is a valuable food that is easily digested by people of all ages. Ice cream contains a high amount of substances in its structure such as protein, calcium, vitamins A, D and riboflavin. It is also more concentrated than milk and attracts attention with its higher nutritional value than milk. However, it has been determined that ice cream has insufficient composition in terms of nutritional value as well as some phenolic components, dietary fiber and vitamins and it is considered that it is appropriate to carry out various studies to improve this. In recent years, with the increasing interest in foods that have a positive impact on health, new product development activities in the ice cream industry have accelerated and it is aimed to enrich them with these insufficient ingredients. For this reason, the composition of ice cream; natural antioxidant and dietary fiber-rich content with the addition of the fruit began to attract attention and as a result of the new antioxidant functional ice cream has been produced. Fruit ice creams, which have functional properties, have a nice appearance with natural color substances coming from fruits, and also because of their low fat and cholesterol content, many people have become the focus of interest and strengthened to become a sought-after food.

**Keywords:** Ice cream, Fruit ice cream, Functional food

## GİRİŞ

Canlılığın devamı devamı ve birtakım gelişimsel faaliyetlerin gerçekleşebilmesi için gereken protein, yağ, karbonhidrat ve mineral madde gibi bileşenleri bünyesinde dengeli bir biçimde barındıran süt, canlılar için önemli bir besin kaynağıdır. Özellikle gelişme çağındaki çocuklar, emziren anneler, hamileler ve gençler için oldukça önemli olan süt, tüm yaş grupları tarafından tüketilmesi gereken muazzam bir gıdadır. Organizmanın sütün bileşimindeki maddelerden maksimum düzeyde faydalanması, onu doğrudan tüketmesiyle gerçekleşir. Fakat süt çabuk bozulabilen ve taşınması zor olan bir gıda olduğu için çeşitli işlemler sonucunda bozulmalara karşı dayanıklılığı arttırılıp, daha kolay taşınabilen ve hacim olarak da daha az yer kaplayan ürünlere dönüştürülmüştür. Sütten elde edilen bu süt ürünleri içerisinde de dondurma, ülkemizde ve dünyada oldukça önemli bir noktaya gelmiştir (Çeliker, 2008).

Genel olarak kendine has özellikleriyle ilgi çeken, beğenilen tadı ve aroması ile severek tüketilen dondurma basit sindirilme özelliğiyle de dikkat çeken bir gıdadır. Dondurma özellikle protein, kalsiyum, fosfor, vitamin A, vitamin D ve riboflavince oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Dondurma tüketim oranı Avrupa ülkeleri ve ABD'de Türkiye'ye oranla çok daha fazladır. Bu durum Türkiye'de soğuk havalarda dondurma tüketilmez algısından ortaya çıkmaktadır. Tüketici algısını değiştirip dondurma tüketimini arttırmak için Türkiye'de son zamanlarda modern tesisler kurulmuş ve bu tesislerde kaliteli dondurma üretimi yapmak amacıyla çeşitli eğitim programlarının düzenlenmesi gibi birtakım destekleyici çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Yıldız, 2017).

Dondurma günümüzde yalnızca sıcak havalarda tüketilen bir ürün olarak görülmeyip, yılın her mevsiminde tüketilebilecek bir gıda olarak algılanmaya başlanmıştır. Modern dondurma tesislerinin ortaya çıkması ile birlikte eskiden çok çeşidi olmayan ve sıradan olan dondurmaların yerini gelişmiş, farklı lezzet, aroma ve yapıdaki ürünler almıştır. Son yıllarda çok çeşitli hammadde ve değişik teknikler kullanılarak 240 farklı dondurma türü üretimi yapıldığı bildirilmektedir (Gürpınar, 2019). Dondurmanın çeşitli türleri mevcuttur. Yalnızca süt ürünlerinden elde edilenler Dairy Ice Cream, yapısında bitkisel yağ bulunduranlar Mellorine, bir miktar süt ile birlikte meyve ve meyve suyundan yapılanlar Sherbet; su, şeker ve meyve konsantresinden yapılanlar Water Ice, dondurma benzeri olup yağ içeriği düşürülmüş olanlar ise Ice Milk olarak bilinmektedir (Gürsoy, 2019). Süt, şeker, stabilizatör, emülgatör gibi katkı maddeleri ve aroma maddelerini içeren karışımın (miks), pastörizasyon işlemine tabi tutulup tekniğine uygun olarak dondurulması sonucu elde edilen ürüne dondurma denir (Çelik ve ark., 2009).

Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliği'ne göre ise dondurma; içerisinde tat ve çeşidine göre, süt ve/veya süt ürünlerini, içme suyu, şeker ve izin verilen katkı maddelerini bulunduran, istenildiğinde salep, yumurta ve/veya yumurta ürünleri, aroma maddeleri ve çeşni maddeleri gibi bileşenleri içeren karışımın pastörizasyon sonrası tekniğine uygun olarak işlenmesi ve dondurulması ile elde edilen, yumuşak halde ya da sertleştirildikten sonra tüketime sunulan üründür (Anonim, 2004). Dondurma üretim basamakları basit olarak hammaddelerin birbirleriyle karıştırılması ardından pastörizasyon, homojenizasyon, olgunlaştırma ve dondurma işlemlerinden oluşmaktadır (Gürpınar, 2019).

Türkiye'de dondurma üretimi geleneksel yöntemler ve endüstriyel yöntemler olmak üzere iki farklı türde yapılmaktadır. Küçük ölçekli işletmelerde geleneksel denilen yöntem tercih edilirken, büyük ölçekli işletmelerde endüstriyel yöntem tercih edilmektedir. Geleneksel üretim yapılan işletmelerde dondurmayı yapan usta kendi bilgi ve becerisine göre bir ürün elde etmekte olup bu tarz dondurmaların kısa süre içinde tüketime sunulması sağlanmaktadır. Ancak modern üretimin gerçekleştiği büyük işletmelerde hijyen kuralları dikkate alınarak üretim yapılmaktadır. Bu tip işletmelerde de dondurma üretimi dönemlik değil tüm yıla yayılarak yapılmakta ve ürün çeşitliliği sağlanmaktadır (Hong ve Marshall, 2001; İşleyici ve ark., 2016). Türkiye'de üretilen dondurmaların % 75'lik kısmı endüstriyel üretim yapan işletmeler tarafından üretilmektedir (Hezer, 2019).

Dondurma A, D, E, K, B2, B6, B12 ve C vitaminlerini içermektedir. Mineral maddelerden de fosfor, çinko, potasyum, sodyum, magnezyum ve demir gibi çeşitli mineralleri yapısında bulundurur. Dondurma sütten daha yoğun bir kıvamda olması sebebiyle 3-4 kat daha fazla süt yağı ve %12 ile %16 oranında protein içeriğine sahiptir. İçerisindeki bu süt proteinleri ve esansiyel amino asitler ile oldukça değerli ve faydalı bir üründür (Uğurlu, 2018). Ayrıca bileşimine besleyici nitelikte çeşitli gıdaların eklenmesi dondurmayı besin içeriği açısından daha kıymetli bir gıda yapmaktadır. Birçok tatlıya göre kalori içeriğinin daha düşük olması ve süt gibi doğal besinler ile yapılıyor olması da dondurmanın çoğu diyet listelerinde yer almasını sağlamaktadır (Hezer, 2019). İdeal bir dondurmada % 15 şeker, % 11 yağsız kuru madde, % 12 yağ, % 0,3 stabilizatör ve

emülgatör, toplam kurumadde ise % 38,3 oranında olmalıdır. Ayrıca dondurma bir bileşen olarak görülmese de yapısında önemli miktarda hava kabarcığı ihtiva etmektedir (Gürpınar, 2019). Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliği'ndeki (Tebliğ No: 2004/45) dondurma bileşimine ait değerler Tablo 1'de gösterilmektedir (Anonim, 2004).

**Tablo 1.** Dondurmanın bileşimi

| Ürün Grupları | Toplam Kurumadde (Ağırlıkça %) | Süt Yağı (Ağırlıkça %) | Yağsız Kurumadde (Ağırlıkça %) | Yağsız Süt Kurumaddesi (Ağırlıkça %) |
|---|---|---|---|---|
| Yarım yağlı dondurma (En Az) | 31 | 3 | 28 | 10 |
| Yağlı dondurma (En Az) | 36 | 8 | 28 | 10 |
| Tam yağlı dondurma (En Az) | 40 | 12 | 28 | 10 |
| Yağlı Maraş dondurması (En Az) | 32 | 4 | 28 | 8 |
| Yarım Yağlı Maraş dondurması | 30 | 2 | 28 | 8 |
| Yağlı Maraş usulü dondurma | 32 | 4 | 28 | 8 |

**Dondurma yapımında kullanılan maddeler ve özellikleri**

Süt yağı veya koyulaştırılmış süt, yağsız süt tozu, şeker, emülgatörler, stabilizatörler, renk ve aroma vericiler dondurma üretiminde kullanılan başlıca ingradientlerdir. Bunun yanında üretilecek dondurmanın çeşidine göre meyveler ve kuru yemişler gibi farklı yardımcı maddelerin de kullanımı yapılmaktadır (Yıldız, 2017).

**Süt yağı**

Yağ dondurmada duyusal özelliklerin iyileştirilmesinde ve çekiciliği arttırmada kullanılan önemli bir bileşendir. Dondurma yapımında kullanılan yağ son ürüne pürüzsüz ve kremsi bir yapı kazandırarak dondurmada mevcut olan havanın dağılımını düzenler ve fiziksel özellikleri bakımından iyi kalitede bir dondurma üretilmesine katkıda bulunur. Bunların yanında ayrıca dondurmaya hoşa giden bir tat ve aroma kazandırmaktadır (Adapa ve ark., 2000; Hatipoğlu, 2007). Süt yağı dondurma üretiminde kullanılan başlıca yağdır. Fakat bazı ülkeler nadir olarak bitkisel yağlardan da faydalanmaktadır. Süt yağı gerek yağ asidi kompozisyonu gerekse kendine has olan aroması ile dondurma üzerinde daha etkili sonuçlar doğurmaktadır. Bu sebeple iyi kalitede bir dondurma üretimi için süt yağı oldukça önemlidir (Hatipoğlu, 2007). Süt, tereyağı, yağlı süt tozu, sadeyağ, krema veya kaymak gibi gıdalar süt yağı kaynaklarını oluşturmaktadır. Dondurmada, tereyağ veya sadeyağ kullanılacaksa tuzsuz olmasına dikkat etmek gerekmektedir. Eğer üretimde süt yağı kaynağı olarak yağlı süt seçilecekse sütteki yağın yetersiz geldiği noktada eksiği tamamlamak için krema, sadeyağ veya tereyağı ilave edilebilmektedir. Ayrıca kremanın dondurmadaki yağ oranını arttırmada en etkili yağ kaynağı olduğu da bildirilmektedir (Yıldız, 2017).

**Şeker**

Şeker, dondurmanın tekstürünün düzenlenmesi ve hoşa giden aromanın elde edilmesinde etkin bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda dondurmaya tat ve yoğunluk kazandırmaktadır. Dondurma endüstrisinde şeker çeşitlerinde en çok mono ve dissakkarit olanlar tercih edilmektedir (Uğurlu, 2018). Çoğunlukla kullanılan şekerler ise sakkaroz, glikoz, invert şeker ve nişasta şuruplarıdır. Düşük kalorili dondurma üretiminde ayrıca yapay tatlandırıcılar olan sakkarin ve sorbitol de kullanılmaktadır. Ancak yapay tatlandırıcılar ürünün yapısını olumsuz yönde etkileyerek istenmeyen kırılgan ve kaba yapının oluşmasına neden olmaktadırlar (Gürsoy, 2019; Yıldız, 2017).

Çabuk çözünebilme özelliği ve iyi derecede tatlılık vermesi sebebiyle dondurma üretiminde yoğun olarak tercih edilen şeker sakkarozdur. Bundan başka nişasta şurubu ve glikoz kullanımı da yapılmaktadır. Glikoz

ve nişasta şurubu dondurmada herhangi bir tat değişikliğine neden olmadan kurumadde miktarını istenilen seviyeye getirmektedir. Sakkaroz, glikoz ve nişasta şurubunun dışında laktozun dondurma üretiminde kullanımı pek tercih edilmez. Tercih edilmeme sebebi ise kullanılacak miktarın tam olarak ayarlanmadığı takdirde dondurmada bazı fiziksel bozukluklara sebep olabilecek olmasıdır. Şekerin mikse katılım oranının iyi ayarlanması önemlidir. Kullanılması gerekenden daha az miktarda şeker katılımı iri buz kristallerinin oluşmasına, dolayısıyla kalitesiz bir dondurmanın elde edilmesine sebep olur. Aynı zamanda fazla katılması da yoğunluğu arttırır, ürünün donma noktasını düşürür ve katılaşma aşamasında problemler oluşmasına neden olur. Şeker, dondurma türlerine farklı oranlarda ilave edilmekte olup; sade dondurma karışımlarına % 10–16, meyveli ve çikolatalı dondurma karışımlarına % 16–18 oranında ilave edilmektedir (Yıldız, 2017).

**Yağsız Süt Kurumaddesi**

Dondurma üretiminde yağsız süt kurumaddesi kaynakları olarak koyulaştırılmış süt, yağsız süt, yağsız süt tozu ve tatlı yayıkaltı gibi gıdalar kullanılmaktadır (Yıldız, 2017). Yağsız süt kurumaddesi dondurma üzerinde önemli derecede tekstür ve kıvam özelliklerini iyileştirici faaliyetler göstermektedir. Aynı zamanda kullanılan bu yağsız süt kurumaddeleri dondurmada konsantrasyon artışına sebep olarak besin değeri yüksek bir ürün elde edilmesini sağlamaktadırlar (Hatipoğlu, 2007).

Dondurma endüstrisinde oksidasyon riski yüksek olan yağlı süt tozları kullanımı genellikle tercih edilmemektedir. Koyulaştırılmış sütler ise dondurmada dövülebilirliği arttırması ve sıkı bir yapının oluşumunu desteklemesi açısından önemlidir. Fakat koyulaştırılmış sütler de çok yoğun kıvamları nedeniyle ürüne işleme aşamasında problemler ortaya çıkarmaktadır. Aynı zamanda bileşimindeki laktoz ile kumlu bir yapı oluşumuna neden olabilmektedir. Bu sebeple dondurma üretiminde tatlı yayıkaltı, toplam süt yağsız kuru madde miktarının %20 si oranında kullanıldığı takdirde kullanımı önerilmektedir (Gürsoy, 2019). Yağsız kuru madde miktarı %11-11,5 olan dondurma miksinden %12 oranında yağ içeren dondurma elde edilmektedir. İyi kalitede bir dondurma üretimi için bu oranlara çok dikkat edilmesi gerekmektedir (Yıldız, 2017).

**Stabilizatörler**

Stabilizatör maddeler serbest haldeki suyu bağlayıcı özellikleri ile dondurma yapımında kıvam arttırıcı olarak tercih edilmektedirler. Dondurmada pürüzsüz, homojen bir yapı oluşumunda ve ürünün depolanma aşamasında şekillenebilecek istenmeyen bir durum olan büyük buz kristallerinin oluşumunu engellemek amaçlı kullanılmaktadırlar. Ayrıca ani sıcaklık değişimlerinde ürünün var olan yapısının korumasını sağlayarak kaliteli bir dondurma üretiminin oluşmasını desteklemektedirler (Atsan ve Çağlar, 2008).

Jelatin, keçiboynuzu sakızı, arap sakızı, guar sakızı, agar, karragen, sodyum karboksi metil selüloz ve metil selüloz dondurma üretiminde en çok kullanılan başlıca stabilizatör maddelerdir. Salep, nişasta ve jelatin ise ülkemizde geleneksel yöntem ile dondurma imalatının yapıldığı işletmelerde tercih edilmektedir. Stabilizatör madde çoğunlukla % 0,1 -0,5 oranlarında kullanılmaktadır. Ancak yağsız dondurmalar % 1,0 oranında stabilizatör kullanımına ihtiyaç duymaktadır (Gürsoy, 2019; Hatipoğlu, 2007; Atsan ve Çağlar, 2008).

**Emülgatörler**

Gıdalarda yüzey gerilimini azaltarak dispers bir yapının oluşmasına destek olan maddelere emülgatörler denilmektedir (Baer ve ark., 1997). Emülgatör maddeler gıdalarda tekstür, viskozite ve duyusal özelliklerin gelişiminde olumlu etkiler göstererek ürünün depolanma aşamasında çıkabilecek çeşitli fiziksel sorunların önlenmesinde olumlu etki göstermektedirler (Güven ve ark., 2010). Ancak emülgatörlerin dondurmadaki görevi yalnızca yüzey gerilimini azaltmak değildir. Ayrıca gıdanın içerisindeki bileşenlere etki ederek onun işlevselliğini arttırır ve yağ kristalizasyonunun düzenlenmesini sağlar. Buna göre emülgatörlerin görevleri kullanıldıkları ortama göre değişim gösterir denilebilmektedir (Koçan ve Koçak, 2002).

Emülgatör maddeler dondurma üretiminde bileşimde mevcut olan yağın dağılmasına etki ederek daha homojen bir ürün elde edilmesinde, erimeye karşı dayanıklılığın arttırılmasında, protein- yağ arasındaki ilişkinin etkileşimini kolaylaştırmada ve miksin hava ile birleşmesini sağlayıp pürüzsüz, kremsi bir dondurma elde edilmesinde kullanılan oldukça önemli olan katkı maddeleridir. Ayrıca dondurmada dövme süresini kısaltarak dövülme kalitesini arttırır ve hoşa giden bir dondurma elde edilmesine katkıda bulunurlar (Atsan ve Çağlar, 2008). Yumurta sarısı dondurma yapımında kullanılan ilk emülgatör maddedir. Kullanımı çok yaygın değildir ancak yine de bazı Fransız dondurmalarına özgü olan aromayı kazandırmak amacıyla kullanımı tercih edilmektedir (Gürsoy, 2019). Bugün ise dondurma endüstrisinde en çok kullanılan emülgatör maddeler yağ asitlerinin mono ve digliseritleri, lesitin ve polisorbatlardır (Koçan ve Koçak, 2002; Güven ve ark., 2010).

**Aroma ve Renk Maddeleri**

Dondurma üretiminde yapay ve doğal aroma verici maddelerden faydalanılmaktadır. Çeşitli meyve parçacıkları, meyve püreleri, meyve suları, kuruyemişler ve çikolata gibi ürünler doğal aroma vericilerdir. Aseton, allil-sinnemat, metil-neftil keton, izobütil bütirat, anizil propiyanat ise yaygın olarak kullanılan yapay aroma vericilerdendir. Yapay aroma verici maddeler dondurmaya yalnızca aroma vermez aynı zamanda hoş kokusunun oluşumununa da katkı sağlarlar (Gürsoy, 2019). Dondurma yapımında kullanılan renk maddeleri de doğal ve yapay olan renklendiriciler olarak ikiye ayrılmaktadır. Doğal renklendiriciler hayvansal, bitkisel, mikrobiyal ve mineral kökenli maddelerden elde edilmektedir. Pancar kökü kırmızısı, karamel, riboflavin, antosiyaninler, klorofiller ve karotenler ise organik olan doğal renklendiricilerdir. Yapay renklendiriciler daha bol ve maliyetinin düşük olması sebebiyle dondurma üretiminde tercih edilen kaynaklardır. Orange B, yellow no:5, violet no:1, red:621 vb gibi yapay maddeler dondurma üretiminde kullanılan çeşitli renklendirici maddelerdir. Renklendiricilerin pastörizasyon işleminden hemen sonra veya dondurma sıvı formdayken katılmaları önemlidir (Gürsoy, 2019; Yıldız, 2017).

**Su ve Hava**

Kaliteli bir dondurma üretimi için kullanılan suyun ve havanın özelliklerinin iyi olması gerekmektedir. Kullanılan su mikrobiyolojik açıdan içme suyu özelliklerini taşımalıdır. Ayrıca arıtılmış, temiz bir hava kullanımına özen gösterilmelidir (Yıldız, 2017).

**Meyveli dondurmaların önemi**

Dondurma birçok çeşidi olan ve bu geniş ürün çeşitliliğiyle her yaş grubundan insanın zevkine hitap eden bir süt ürünüdür. Meyve ve meyve sosları ilave edilerek tadı ve aroması geliştirilmiş çeşitli dondurmalar, sadece sütten elde edilen sade dondurmaların yanı sıra dondurmacılık sektöründe oldukça önemli noktalara gelmiştir (Öksüztepe ve ark., 2005). Ayrıca tüketicinin beğenisini kazanarak daha fazla karşılaşılan ve ön planda tutulan dondurma çeşidi olmuştur (Uğurlu, 2018). Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliği'ne göre meyveli dondurma; dondurma karışımına meyve, meyve suyu, meyve konsantresi, meyve püresi, meyve ezmesi katılması ile üretilen dondurmayı ifade etmektedir (Anonim, 2004). Yapımı sırasında katılan meyveler, meyve püreleri, meyve suları, kuruyemişler vb. dondurmanın besleyici özelliğini daha da arttırmaktadır (Aloğluve ark., 2018). Meyve çeşitliliği ve mevcut olan meyvenin maliyetinin uygunluğu ile ülkemiz meyveli dondurma üretimi için oldukça uygun özellikler taşımaktadır. Meyveli dondurma yapımında başlıca; meyveler, meyve pulpları, konserve meyveler, meyve ekstratları ve esansları kullanılmaktadır. Lezzet, aroma verici ve renklendirici olarak ise çoğunlukla vanilya, kakao ve çeşnili meyve esansları tercih edilmektedir. Bunun sonucunda çok değişik tat ve aromada yeni ürünler dondurma endüstrisine kazandırılmaktadır (Özcan ve Kurdal, 1997; Öksüztepe ve ark., 2005). Ayrıca meyveli dondurma üretiminde kullanılacak olan meyve oranının da Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliği'nde en az %15 olması gerektiği bildirilmektedir (Anonim, 2004). Meyve; içeriğindeki lif, vitamin, mineral ve antioksidan maddeleri ile insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan bir gıdadır. Bu sebeple gıda endrüstrisinde çeşitli ürünlere ilavesi gün geçtikçe artmaktadır. Bir süt ürünü olan dondurma, meyvede bulunan bu değerli bileşenlerce fakirdir. Bundan dolayı günümüzde içeriğinin zenginleştirilmesi ve sağlık üzerine olumlu etkilerinin oluşabilmesi için dondurmaya çeşitli meyvelerin ilavesi yapılarak fonksiyonel bir kimlik kazandırılmaktadır. Elde edilen bu dondurmaların kolesterol ve yağ içeriklerinin önemli miktarda düştüğü ayrıca dikkat çekmektedir (Erkaya Kotan ve ark., 2018). Meyveler, yapılarında barındırdıkları doğal antioksidan maddeler ve bazı vitaminler ile eklendikleri dondurmaya antioksidan etki kazandırarak fonksiyonel özellik katmaktadır. Ayrıca antioksidan bileşenlerinin yanında diyet lifi içeriği de oldukça yüksek olan meyvenin sap, kabuk ve çekirdek gibi kısımları da dondurma üretiminde kullanılmaktadır. Meyveli dondurma sağlığa olumlu etkileri taşıyan bu bileşenlerce zengin olması bakımından son zamanlarda tüketicilerin sağlıklı beslenme arayışına karşılık vermiş ve büyük ilgi görmüştür (Türkmen ve Gürsoy, 2017).

**SONUÇ**

Son yıllarda yaşam tarzlarının değişmesiyle birlikte tüketicilerin gıdalardan beklentileri de farklılık göstermiştir. Günümüzde sağlığa ek fayda sağlayan veya çeşitli hastalıklardan korunmayı destekleyen gıdalar ön plana çıkmakta ve ilgi görmektedir. Süt ürünleri birçok insanın günlük diyetlerinde yer alan ve hayatın bir parçası haline gelmiş, besin değeri yüksek olan önemli bir gıda grubudur. Süt ürünlerinde farklı işlemler uygulanarak yeni ürün üretimi sağlamak tüketicilerin varolan bu beklentilerini karşılamak adına yapılabilecek en önemli işlemlerden biridir. Bir süt ürünü olan dondurma, zengin besin değeri ile gıda sektöründe oldukça

önemli bir yere sahiptir. Ayrıca her yaş grubundan insanın severek tükettiği, kolay sindirilebilme özelliğiyle de üstün özellikler taşımaktadır. Bu sebeple farklı aroma ve bileşimde ürün eldesine oldukça elverişli bir yapısı vardır. Bu doğrultuda bakıldığında sağlığa olumlu yönde etkileri olduğu bilinen, doğal antioksidan maddeleri ve diyet liflerini yapısında yüksek oranda barındıran meyveler, kuru meyveler ve meyve çeşnileri; dondurma üretiminde çeşitliliği sağlamak ve antioksidan özellik kazandırmak amacıyla dondurma miksine ilave edilebilecek en güzel kaynaklardır denilebilir. Çeşitli meyvelerin ilave edilmesiyle elde edilen bu meyveli dondurmalar kazandığı fonksiyonel kimlik ve zengin besin içeriği ile günümüz şartlarında tüketicinin ilgi odağı olmakta ve tüketimi gittikçe artış gösteren bir ürün potansiyeli taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

Adapa S, Dingeldein H, Schmidt KA, Herald TJ 2000. Rheological properties of ice cream mixes and frozen ice creams containing fat and fat replacers. Journal of Dairy Science, 83(10): 2224-2229.

Aloğlu HŞ, Gökgöz Y, Bayraktar M 2018. Kocayemiş (Dağ Çileği-*Arbutus unedo* L.) meyveli dondurma üretimi, fiziksel, kimyasal ve duyusal parametreler açısından irdelenmesi. Gıda, 43(6): 1030-1039.

Anonim 2004. Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliği (Tebliğ No: 2004/45).

Atsan E, Çağlar A 2008. Farklı stabilizör kullanımının dondurmanın bazı fiziksel ve duyusal özellikleri üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 39(2): 195-200.

Baer RJ, Wolkow MD, Kasperson KM 1997. Effect of emulsifiers on the body and texture of low fat ice cream. Journal of Dairy Science, 80(12): 3123-3132.

Çelik Ş, Cankurt H, Doğan C 2009. Safran ilavesinin sade dondurmanın bazı özelliklerine etkisi. Gıda, 35(1): 1-7.

Çeliker MB 2008. Alıç meyvesinin pekmeze işlenerek dondurma üretimine ilavesiyle dondurmanın kalite kriterleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 61 s.

Erkaya Kotan T, Ürkek B, Şengül M 2018. Kivi ilaveli dondurmaların bazı fizikokimyasal, reolojik ve duyusal özelliklerinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 49(2): 111-117.

Gürpınar S 2019. Meyve lifleri kullaniminin dondurmanin kalitesi ve besinsel özellikleri üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 86 s.

Gürsoy A 2019. Dondurma teknolojisi. http://cv.ankara.edu.tr/duzenleme/kisisel/dosyalar/29052015182125.pdf

Güven M, Karaca OB, Yaşar K 2010. Düşük yağ oranlı Kahramanmaraş tipi dondurma üretiminde farklı emülgatörlerin kullanımının dondurmaların özellikleri üzerine etkileri. Gıda, 35(2): 97-104.

Hatipoğlu A 2007. Bazı yağ ikame maddeleri kullanılarak yapılan yağ oranı düşürülmüş dondurmaların kalite özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, 109 s.

Hezer F 2019. Farklı oranlarda semizotu ilavesinin dondurmanın fiziksel, kimyasal ve duyusal özelliklerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gümüşhane, 72 s.

Hong SH, Marshall RT 2001. Natural exopolysaccharides enhance survival of lactic acid bacteria in frozen dairy desserts. Journal of Dairy Science, 84(6): 1367-1374.

İşleyici Ö, Sancak H, Tuncay RM 2016. Microbiological quality of packaged and unpackaged ice cream sold in Van province. Van Veterinary Journal, 27(2): 57-67.

Koçan D, Koçak C 2002. Vanilyalı dondurma üretiminde Quest Admul Mg 4143 emülgatörünün farklı kullanım olanaklarının dondurma niteliklerine etkisi. Gıda, 27(5): 369-377.

Öksüztepe G, Patır B, İlhak Oİ, Şeker P 2005. Elazığ'da tüketime sunulan meyveli ve çeşnili dondurmaların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. Veteriner Bilimleri Dergisi, 21(1-2): 71-78.

Özcan T, Kurdal E 1997. Bursa ili merkezinde satılan meyveli dondurmaların kimyasal ve mikrobiyolojik nitelikleri üzerine araştırma. Gıda, 22(3): 217-225.

Türkmen N, Gürsoy A 2017. Fonksiyonel dondurma. Akademik Gıda, 15(4): 386-395.

Uğurlu G 2018. Süte farklı oranlarda böğürtlen, yaban mersini ve çilek pulpu katılarak yapılan meyveli dondurmaların kalitesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 68 s.

Yıldız A 2017. Dondurma üretiminde bal kabağı kullanımı ve kalite üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 49 s.

# Süt ve süt ürünlerinde aflatoksinlerin önemi ve Türkiye'deki durum

Fatıma Çelikahmetoğlu[1], Deren Tahmas-Kahyaoğlu[2*]

[1] Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı; Kastamonu, Türkiye.
[*2] Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü; Kastamonu, Türkiye.

*Sorumlu yazar e-mail: dtkahyaoglu@kastamonu.edu.tr

## Özet

Aflatoksin bazı hayvan yemleri, yağlı tohumlar, baharatlar, süt ve süt ürünlerinde karşımıza çıkan karsinojenik ve toksik maddelerdir. Bazı gıdalar ve hayvan yemleri; işleme, depolama veya taşıma gibi işlemler esnasında aflatoksinler ile kontamine olabilmektedirler. Aflatoksin; başlıca Aspergillus türü küfler tarafından meydana gelmektedir. Bu küfler başlıca *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius* olarak sıralanabilmektedir. Kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanların et ve sütlerinde aflatoksine rastlanmaktadır. Aflatoksinler $B_1$, $B_2$, $M_1$, $M_2$, $G_1$, $G_2$ şeklinde altı ana gruptan oluşur. $AFB_1$ en toksik olanıdır. $AFM_1$, $AFB_1$'in; $AFM_2$ ise $AFB_2$'nin sütle hayvan vücudundan atılan metabolitidir. Süt ile hayvan vücudundan atılan bu ürünler süt ve süt ürünlerinde karşımıza çıkmaktadır. $AFM_1$ pastörizasyon ve UHT gibi yöntemler ile uzaklaştırılamadığı için süt ve süt ürünlerinde tehlike arz etmektedir. Bu çalışmada; aflatoksinin gıdalarda oluşumu, süt ve süt ürünlerindeki varlığı ele alınmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Aflatoksin, Süt, Peynir, Tereyağı, Yoğurt

# The importance of aflatoxins in milk and dairy products and the situation in Turkey

## Abstract

Aflatoxins are carcinogenic and toxic substances encountered in some animal feeds, oil seeds, spices, milk and dairy products. Some foods and animal feeds; may be contaminated with aflatoxins during processing, storage or transport. Aflatoxin; It is mainly caused by molds of the species Aspergillus. These molds can be listed as *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*. Aflatoxin is found in meat and milk of animals fed with contaminated feed. Aflatoxins are composed of six main groups: $B_1$, $B_2$, $M_1$, $M_2$, $G_1$, $G_2$. $AFB_1$ is the most toxic. $AFM_1$ is the metabolite of $AFB_1$ and $AFM_2$ is the metabolite of $AFB_2$ excreted from the animal body by milk. These products, which are thrown from milk and animal body, appear in milk and dairy products. $AFM_1$ is dangerous for milk and dairy products as it cannot be removed by pasteurization and UHT methods. In this study; formation of aflatoxin in foods and its presence in milk and dairy products.

**Keywords:** Aflatoxin, Milk, Cheese, Butter, Yogurt

## GİRİŞ

### Aflatoksinlerin insan sağlığı üzerine etkileri

Aflatoksinler özellikle *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, Penicillum ve Rhizopus gibi küflerin; üremeleri için uygun koşulların sağlanması halinde (nem, sıcaklık, yeterli oksijen miktarı ve su aktivitesi gibi) sentezledikleri toksik maddelerdir. Günümüzde küflerle alakalı pek çok araştırma yapılmış ve 300.000'den fazla küf olduğu, bu küflerin yaklaşık 250 adedinin mikotoksin ürettiği ve sadece 20 küf türünün insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilecek etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (Kireçci ve ark., 2007).

Aflatoksinlerin zararlı etkilerinin belirlenmesinde geçmişte yaşanmış pek çok olay etkili olmuştur. Yemlerde nispeten yüksek oranda aflatoksin olması hayvanlar için öldürücü olabilmektedir. Tavşan, ördek ve domuz gibi hayvanlar özellikle hassastır (LD50= 0,30, 0,35 ve 0,62 mgkg-¹) (Cotty ve ark.,1994). Örneğin 1960'lı yıllarda İngiltere'de yerfıstığı küspesi ile beslenen yaklaşık 100.000 kadar hindi telef olmuş ve sebebi

belirlenememiştir. Bu nedenle bu hastalığa hindi X hastalığı (turkey X disease) adı verilmiştir. Yine aynı tarihlere bakılacak olursa İngiltere ve bazı Doğu Afrika ülkelerinde kümes hayvanlarının aynı şekilde telef olduğu görülmektedir. Bu ölümler sonucunda araştırmalar yoğunlaştırılmış ve ölümlere *A.flavus*'un ürettiği toksik maddenin; yani aflatoksinin sebep olduğu belirlenmiştir (Sert, 1983). Aynı zamanda 1984 senesinde Hindistan'da bir köyde 106 kişinin öldüğü ve buna araştırılan mısırlardaki 0,25-15,6 ppm arasındaki aflatoksinin sebebiyet verdiği anlaşılmıştır (Kök, 2006). Türkiye'de ise aflatoksin ile ilgili çalışmalar ilk olarak 1967 yılında Kanada'ya pazarlanan 10 ton fındığın iade edilmesi ile başlamıştır (Sert, 1983).

Aflatoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin belirlenmesinin ardından Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Uluslarası Kanser Araştırma Kuruluşu $AFB_1$'i birinci, $AFM_1$'i ikinci derece karsinojen maddeler kategorisine almışlardır (Akdemir ve Altıntaş, 2004). Bu toksik madde insanlar ve hayvanlar için toksik, mutajenik ve kanser yapıcı özelliklere sahip ikincil metabolitlerdir (Dinçel ve ark., 2012). Aflatoksikoz; aflatoksin alımından kaynaklanan zehirlenmedir. İki aflatoksikoz şekli tanımlanmıştır: Birincisi, doğrudan karaciğer hasarı ve daha sonra hastalık veya ölümle sonuçlanan akut ciddi zehirlenmedir, ikincisi ise kronik maruz kalmadır (Williams ve ark., 2004).

Aflatoksin varlığı insan ve hayvan sağlığı açısından sorun teşkil etmesinin yanında ekonomik açıdan da büyük kayıplara yol açmaktadır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 1985'te dünyadaki gıda üretiminin %25'nin mikotoksinler aracılığıyla kirlendiğini belirtmiştir (Özkaya ve Temiz, 2003).

## Toksin oluşumu için gerekli koşullar

Aflatoksinler gıda ve yemlerde hasat, kurutma veya gelişim aşamalarında meydana gelebilmekte; ürünün nemi, kurutulma hızı, ortam sıcaklığı, mantar veya sporlarının miktarı, gelişen küf türlerinin toksin oluşturabilme kabiliyetleri, ortamdaki mikroorganizmaların rekabet güçleri, atmosferde bulunan gazların bileşimi gibi pek çok parametreden etkilenmektedirler. Bunların yanı sıra gıda maddelerinde aflatoksin oluşumu ve misellerin gelişimi su aktivitesi ve sıcaklık ile kontrol altına alınabilmektedir (Yentür ve Er, 2011).

Bu küfler her zaman toksik etki göstermemektedirler. Toksin üretimi için bazı çevresel şartların optimum seviyelere ulaşmaları gereklidir. Yaklaşık %70 üzeri nisbi nem, 24°C ile 35°C arasında sıcaklık, yeterli oksijen seviyesi gibi özellikler örnek olarak verilebilir (Akdemir ve Altıntaş, 2004; Oruç, 2003). Sıcaklık seviyesi 37°C civarına gelirken verim kademeli olarak azalmaktadır. Aflatoksin üretimi, karbon kaynaklarından da yüksek oranda etkilenir. Sakkaroz ve glikoz, $AFB_1$'in sentezi için en ideal karbonhidratlardır. Karbon kaynağının mikotoksin sentezi üzerindeki inhibisyonu veya indüksiyonu, sporülasyon üzerindeki etkisiyle ilişkili olabilir (Wang ve ark., 2019). Pepton, maya özütü, malt özü, yerfıstığı veya hindistan cevizi gibi ham doğal özler içeren ortamlarda yüksek antioksidan verimleri elde edilmiştir. Aflatoksin üretiminin, artan karbondioksit ve azalan oksijen konsantrasyonları ile azaldığı bildirilmektedir (Maggon ve ark., 1977). Mikotoksin oluşumu için gerekli bazı parametreler Tablo 1'de verilmiştir (Murphy ve ark., 2006).

**Tablo 1.** Mikotoksin oluşumu için gerekli bazı parametreler

| Mikroorganizma (mikotoksin) | Sıcaklık (ºC) | Aw |
|---|---|---|
| *Aspergillus flavus, A. parasiticus* (aflatoksin) | 33 | 0,99 |
| *Aspergillus ochraceus* (okratoksin) | 30 | 0,98 |
| *Penicillium verrucosum* (okratoksin) | 25 | 0,90-0,98 |
| *Aspergillus carbonarius* (okratoksin) | 15-20 | 0,85-0,90 |
| *Penicillium expansum* (patulin) | 0-25 | 0,95-0,99 |

Süt ve süt ürünleri tüm insanlar tarafından kolay erişilebilir ve besleyici olması sebebi ile sıkça tüketilen ürünlerdir. Özellikle yeni doğmuş bebekler ve gelişmekte olan çocuklar göz önünde bulundurulduğunda onların zayıf bağışıklık sistemlerinin bu denli tehlikeli bir toksik madde ile zarar görmesi kaçınılmaz olmaktadır (Yangılar ve Oğuzhan, 2013). Süt ve süt bazlı ürünler aflatoksin içermesi bakımından tehlikeli ürünler kategorisindedir. Hatta $AFM_1$ "süt toksini" olarak adlandırılmaktadır (Kırdar, 2006).

Aflatoksinler temel olarak $B_1$, $B_2$, $M_1$, $M_2$, $G_1$, $G_2$ formlarında bulunmaktadır. Toksik etkileri göz önüne alındığında en yüksek etkili olan $AFB_1$'dir. Bu sıralama $AFB_1$>$AFG_1$>$AFB_2$>$AFG_2$ şeklinde yapılabilir. $AFB_1$'in sütle hayvan vücudundan ayrılan metaboliti $AFM_1$'dir. Aynı şekilde $AFB_2$'nin metaboliti ise $AFM_2$'dir. Belirtildiği gibi $AFM_1$ ve $AFM_2$, $B_1$ ve $B_2$ aflatoksinlerinin sütle atılan yapıları olduğu için süt, peynir, krema, yoğurt, tereyağı gibi süt ürünlerinde karşımıza çıkabilmektedirler (Oruç, 2005). Yurtdışında yapılan bir çalışmada $AFM_1$ miktarının mevsimsel olarak değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. ELISA yöntemi kullanılarak 960 adet süt örneği analiz edilmiş ve kirlenme oranının en fazla kış aylarında olduğu ve yaz aylarına yaklaştıkça $AFM_1$ miktarının azaldığı görülmüştür (Akbar ve ark., 2019).

**Aflatoksin belirleme yöntemleri**

Aflatoksin varlığının belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin başında aşağıdakiler yer almaktadır.

• İnce tabaka kromatografisi (TLC)

• Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

• Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS)

• Enzim bağlanmış immunoabsorbant yöntemi (ELISA)

• Enzim aktivitesine bağlı immunoteknik (EMIT)

Bu yöntemlere ek olarak Flouresans Polarization Immunoassay (FPIA) yöntemi de deneme aşamasındadır (Oruç, 2005).

**Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin varlığı**

Aflatoksinler kontamine olmuş yemlerle beslenen hayvanların et ve sütlerinde kalıntıya sebebiyet verdiği ve bu ürünlerle insan vücuduna geçerek teratojenik, mutajenik, karsinojenik etkileri olduğu bilindiğinden pek çok bilimsel çalışmaya konu olmuştur (Kireçci ve ark., 2007). AFB1'in toksik etki gösterdiği temel organlar karaciğer ve böbrektir (Yentür ve Er, 2011). İnsan ve hayvanlar üzerinde bu kadar olumsuz etkiye sahip toksik madde aflatoksin; ısıl işlemlere karşı oldukça dayanıklıdır. Örneğin, $AFB_1$ 130°C'de dahi parçalanmamaktadır. Bu nedenle pastörizasyon, sterilizasyon gibi ısıl işlemler aflatoksinin toksijenik etkilerini azaltamamaktadır (Sert, 1983). Aflatoksinler temel olarak $B_1$, $B_2$, $G_1$, $G_2$, $M_1$, $M_2$ formlarında bulunmaktadır. Süt ve süt ürünlerinde bu toksinlerden $M_1$ formu karşımıza çıkar. İnsan sağlığı ve hijyeni açısından önem arz etmektedir. Sütteki $AFM_1$'in büyük bir kısmı süt kremasına geçmektedir (Kireçci ve ark., 2007).

**Türkiye'de süt ve süt ürünlerinde aflatoksin varlığı ile ilgili bazı çalışmalar**

Sarıkamış'ta yapılan bir çalışmada 80 adet süt ve peynir örneğinin $AFM_1$ seviyesi belirlenmeye çalışılmış ve ELİSA yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda 80 örnekten 68'inde $AFM_1$'e rastlanmıştır. 68 örnekten 30'unun ise Türk Gıda Kodeksi standart değerlerin üzerinde olduğu belirlenmiştir (Kireçci ve ark., 2007).

Ankara'da yapılan bir çalışmada ise 48 adet çiğ süt örneği araştırılmıştır. Örnekler Ankara ilinde hizmet veren iki fabrikaya gelen 12 farklı kaynaktan alınmıştır. Bu 48 örneğin 34'ü $AFM_1$ içermekte ve 16 örneğin ise Türk Gıda Kodeksi üst limiti olan 0,05 µg/kg sınırını aştığı belirlenmiştir (Akdemir ve Altıntaş, 2004).

Erzurum' da pazara sunulan ayran ve yoğurt örneklerinde $AFM_1$ seviyesi araştırılmıştır. Bu amaçla 80 ayran, 80 yoğurt örneği toplanmıştır. Yoğurt örneklerinin %87,5'inde, ayran örneklerinin ise %90'da $AFM_1$ tespit edilmiştir. Yoğurt örneklerinde en düşük ve en yüksek $AFM_1$ seviyeleri sırasıyla 0,01-0,475 µg/kg iken, ayran örneklerinde 0,006-0,264 µg/kg olarak belirlenmiştir (Atasever ve ark., 2011).

Kars'ta yapılan bir çalışmada toplam 200 örnek incelenmiştir. Bu amaçla sırasıyla 50'şer adet süt, küflü çeçil peyniri, kaşar peyniri ve gravyer peyniri kullanılmıştır. Yapılan değerlendirmeler incelendiğinde süt örneklerinin 28 tanesinde farklı düzeylerde $AFM_1$ belirlenmiştir fakat bu düzeylerin Türk Gıda Kodeksi limitlerine uygun olduğu görülmüştür. Küflü çeçil peynirinin 8, kaşar peynirinin 18 ve gravyer peynirlerinin

34 örneğinde $AFM_1$ gözlemlenmiştir. Fakat belirlenen düzeyler Türk Gıda Kodeksi üst limitini aşmamaktadır (Aksoy ve Sezer, 2019).

Kayseri'de yapılan bir çalışmada ise tereyağı ve kaymak örnekleri $AFM_1$ içeriği bakımından incelenmiştir. Çalışmada 50 tereyağı ve 50 kaymak olmak üzere 100 örnek incelenmiş ve örneklerin hepsinde $AFM_1$ belirlenmiştir. Örneklerin tamamı $AFM_1$ içermesine rağmen sadece 1 tereyağı örneğinin Türk Gıda Kodeksi üst limitini aştığı gözlemlenmiştir (0,129 µg/kg) (Özkan ve Onmaz, 2019).

Konya'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise diğerlerinden farklı olarak 11 adet küflü peynir örneğinde $AFM_1$, $AFB_1$ ve aflatoksin üreten küfler HPLC yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu peynirlerden bir tanesinin analiz edilmesi sırasında sorunlar meydana gelmiştir (Deri tulum peyniri, yağlı ve fazla küf barındırması sebebi ile kolon temizlenmesinde sıkıntılar meydana gelmiş olduğu belirtilmektedir). Geriye kalan 10 örnek incelendiğinde belirlenebilir seviyede $AFM_1$ bulunamamıştır. Aynı zamanda toplam aflatoksin belirlenmesi için yürütülen çalışmada da $B_1$, $B_2$, $G_1$, $G_2$ gözlemlenmemiştir (Güley ve ark., 2013).

Yapılan bir çalışmada Urfa peyniri, mihaliç peyniri, çivil peyniri, otlu peynir ve Kars kaşarı olmak üzere beş çeşit peynirde aflatoksin varlığı araştırılmıştır. Yalnızca Urfa peynirinde tebliğin altındaki değerlerde aflatoksin varlığı belirlenmiştir. Örnek olarak numunelerden birinde 0,0493 (µg/kg) miktarında aflatoksin belirlenmiştir. Yine bu değer Türk Gıda Kodeksi değerlerinin altında kalmaktadır (Dinçel ve ark., 2012).

Karadeniz Bölgesi'ndeki bir araştırmada; aflatoksin belirlenmesinde kullanılan iki farklı yöntemin karşılaştırılması amaçlanmıştır (HPLC ve ELISA yöntemleri). Bu çalışmada 40 adet tereyağı örneği incelenmiş ve herhangi bir $AFM_1$ kalıntısına rastlanmamıştır (Aksoy ve ark., 2016).

Diyarbakır'da yapılan bir çalışmada ise açıkta satılan örgü peynirleri incelenmiştir. ELISA yöntemi kullanılarak aflatoksin belirlemesi yapılmıştır. Toplamda 90 örnek çalışılmış; bu örneklerden 48 adedinde aflatoksin belirlenemezken, 29 örnekte izin verilen limitin altında, 13 numunede ise aflatoksin izin verilen limitin üzerinde olup, en fazla $AFM_1$ 0,610 µg/kg olarak belirlenmiştir (Erkan ve ark., 2009).

Elazığ ilinde yapılan bir araştırmada HPLC yöntemi ile aflatoksin miktarı belirlenmiştir. Toplanan 60 çiğ süt numunesinin 16'sının yasal sınırların altında, 36'sının yasal sınırların içinde ve geri kalan 8'inin ise yasal sınırların üstünde AFM1 içerdiği tespit edilmiştir. Örneklerin 8 tanesinin 0.06-0.08 µg/L arasında AFM1 içerdiği belirtilmiştir (Baygeldi ve Tanyıldızı, 2018).

Erzurum'da tulum peyniri, beyaz peynir, civil peyniri ve kaşar peynirinin içinde olduğu 51 örnekte aflatoksin varlığı tespiti amaçlanarak ince tabaka kromotografisi yöntemiyle analizler yapılmıştır. Sonuç olarak aflatoksine rastlanmamıştır (Sert, 1993).

Kayseri ilinde tüketilen manda yoğurtları üzerine yapılan bir çalışmada 100 farklı manda yoğurdu incelenmiştir. $AFM_1$ seviyesini belirlemek amacıyla ELISA yöntemi kullanılmıştır. Manda yoğurtlarının hepsinde $AFM_1$'e rastlanmıştır. Örneklerden 7 tanesinin ise Türk Gıda Kodeksi üst limitlerini aştığı anlaşılmıştır. Manda yoğurtlarındaki $AFM_1$'in en düşük ve en yüksek seviyeleri ise 0,0027-0,079 µg/kg şeklindedir (Kayaalp ve ark., 2015).

Aflatoksinin süt ürünleri için önemli olması kazeine olan ilgisindendir (Bulca ve Bircan, 2013). Bu sebeple peynir pıhtısında daha fazla toksik madde bulunmaktadır. Bu durum peynir çeşitlerinin aflatoksin bulundurma olasılığını artırmaktadır (Aksoy ve Sezer, 2019). Peynirlerde ve suyunda $AFM_1$ varlığını ve seviyesini etkileyen pek çok etken vardır. Bunlardan biri yukarıda belirtildiği gibi kazein varlığı iken bu etkenler çoğaltılabilir. Örneğin; peynir çeşidi, peynir yapım aşamaları, $AFM_1$'in sütlere bulaşma seviyesi, peynir tekstürü gibi etkenler üretilen peynirdeki toksik madde miktarını etkileyebilmektedir (Erkan ve ark., 2009). Sert peynirlerde yumuşak peynirlere oranla daha fazla $AFM_1$ olduğu bilinmektedir (Aksoy ve Sezer, 2019).

Aflatoksinlerin detoksifiye edilmesi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllarda aflatoksinin biyolojik olarak detoksifiye edilmesi için mikroorganizmalar üzerine yoğunlaşılmaktadır. Gözde mikroorganizma grubu ise laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterileri ticari olarak da kullanılan (starter), toksinlere karşı afinite gösteren mikroorganizmalar olmaları nedeniyle bilimsel çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (Kurhan ve Çakır, 2017). Laktik asit bakterileri ve bifidobakterlerin kullanıldığı bir çalışmada $AFB_1$ ile kontamine olmuş suyun temizlenmesi amaçlanmıştır ve başarıyla sonuçlanmıştır (Elsanhoty ve ark., 2016).

## SONUÇ

Ülkemizde hayvancılık sektörünün yaygın olması, farklı kesimlerin geçim kaynağı olması aflatoksini önemli kılmaktadır. Bu toksik maddeler Aspergillus türü küflerin üremeleri sonucu oluşarak hayvan yemlerine kontamine olmakta ve sütlere geçmektedir. Aflatoksin; süt ve süt ürünlerine $AFB_1$'in metaboliti olan $AFM_1$ olarak geçerek olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Bu nedenle insanlara bulaşması kaçınılmaz olmaktadır. İnsanlarda özellikle immün sistemi zayıf olan bebek ve çocuklarda kalıcı hasarlara sebebiyet vermektedir. Bu toksik maddeler insan vücudunda teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkiler meydana getirirler. Bu sebeple üzerinde pek çok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Aflatoksinin özellikle karaciğerde meydana getirdiği karsinojenik etkiler bu konuda yapılan çalışmaların artması gerektiğinin göstergesidir. Konu ile alakalı olarak hayvancılık ile uğraşan kesimlere gerekli eğitimlerin verilmesi hem halk sağlığı, hem hayvan sağlığı, hem de ülke ekonomisi için önemlidir.

## KAYNAKLAR

Akbar N, Nasir M, Naeem N, Ahmad MU, Iqbal S, Rashid A, Imran M, Aslam GT, Atif M, Salehi B, Sharifi-Rad J, Martorell M, Cho WC 2019. Occurrence and Seasonal Variations of Aflatoxin $M_1$ in Milk from Punjab, Pakistan. Toxins, 11(10): 574.

Akdemir Ç, Altıntaş A 2004. Ankara'da işlenen sütlerde aflatoksin-$M_1$ varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 51: 175-179.

Aksoy A, Atmaca E, Yazici F 2016. Comparative analysis of aflatoxin M1 in marketed butter by ELISA and HPLC. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 22(4): 619-621.

Aksoy A, Sezer Ç 2019. Kars ilinde tüketime sunulan çiğ süt ve bazı peynir çeşitlerinde aflatoksin $M_1$ varlığının değerlendirilmesi. Kocatepe Veteriner Dergisi, 12(1): 39-44.

Atasever MA, Atasever M, Özturan K 2011. Aflatoxin M1 levels in retail yoghurt and ayran in Erzurum in Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 35(1): 59-62

Baygeldi Y, Tanyıldızı S 2018. Elazığ'da üretilen inek sütlerinde aflatoksin M1 düzeylerinin HPLC ile araştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 32(3): 191-195.

Bulca S, Bircan C 2013. Peynirlerde aflatoksin $M_1$ varlığı ve aflatoksin $M_1$ konsantrasyonu üzerine etki eden faktörler. Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 10(1): 31-38.

Cotty PJ, Bayman P, Egel DS, Elias KS 1994. Agriculture, aflatoxins and Aspergillus. In The Genus Aspergillus. Springer, Boston, MA., pp. 1-27.

Dinçel A, Demli F, Özkaya FD, Alatan F, Uzun R, Subaşı SA 2012. Çeşitli peynir örneklerinde aflatoksin $M_1$ Varlığının HPLC ile analizi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 69(2): 89-96.

Elsanhoty RM, Al-Turki IA, Ramadan MF 2016. Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B from contaminated water. Water Science and Technology, 74(3): 625-638.

Erkan ME, Vural A, Güran HŞ 2009. Diyarbakır örgü peynirinde aflatoksin $M_1$ ile verotoksin 1 ve 2 varlığının araştırılması. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1: 19-25.

Güley Z, Uysal HR, Kılıç S 2013. Doğal yolla küflendirilen bazı geleneksel peynirlerde aflatoksin $M_1$, aflatoksin $B_1$ ve aflatoksin üreten küflerin varlığının araştırılması. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 50(2): 145-152.

Kayaalp O, Ertaş N, Serhat AL 2015. Kayseri yöresinde tüketime sunulan manda yoğurtlarında aflatoksin M1 düzeyinin belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 19-23.

Kırdar SS 2006. Süt ve ürünlerinde mikotoksinler. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu.

Kireçci E, Savaşçı M, Ayyıldız A 2007. Sarıkamış'ta tüketilen süt ve peynir ürünlerinde aflatoksin $M_1$ varlığının belirlenmesi. İnfeksiyon Dergisi, 21(2): 93-96.

Kök Z 2006. Aydın ili ve çevresinde üretilen süt ve süt ürünlerinde aflatoksin varlığının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı, 66s.

Kurhan Ş, Çakır İ 2017. Laktik asit bakterilerinin aflatoksin $B_1$ bağlayıcı ve antikanserojen özellikleri. Gıda, 42(6): 809-820.

Maggon KK, Gupta SK, Venkitasubramanian TA 1977. Biosynthesis of aflatoxins. Bacteriological Reviews, 41(4): 822-855.

Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM 2006. Food mycotoxins: an update. Journal of Food Science, 71(5): 51-65.

Oruç HH 2003. Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin $M_1$ ($AFM_1$) ve Türkiye'deki durumu. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 22: 121-125.

Oruç HH 2005. Mikotoksinler ve tanı yöntemleri. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 24(1-2-3-4): 105-110.

Özkan NA, Onmaz NE 2019. Perakende olarak satışa sunulan kaymak ve tereyağlarda aflatoksin M1 varlığı. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16(3): 213-217.

Özkaya Ş, Temiz A 2003. Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(1): 1-21.

Sert S 1983. Gıda ve Yem Maddelerinde Aflatoksinler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(3-4): 181-187.

Sert S 1993. Bazı taze peynir çeşitlerinde küf florası ve aflatoksin içerikleri ile aflatoksin oluşum potansiyellerinin araştırılması; Ilaflatoksin araştırmaları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 24(2): 51-65.

Wang P, Chang PK, Kong Q, Shan S, Wei Q 2019. Comparison of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* at different temperatures and media: Proteome analysis based on TMT. International journal of food microbiology, 310, 108313.

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. The American Journal of Clinical Nutrition, 80(5): 1106-1122.

Yangılar F, Oğuzhan P 2013. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Başlıca Mikotoksin Türü: Aflatoksinler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2): 106-111.

Yentür G, Er B 2011. Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 69(1): 41-52.

# Mikroorganizmalardan biyohidrojen eldesi yöntemlerinin karşılaştırılması ve uygulanabilirliği

Ayşe Elif ATEŞ[1*]

[*1]İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: elifdenizler@istanbul.edu.tr

**Özet**

İklim değişikliği ve hava kirliliği ile mücadelede önemli noktalardan biri yenilenebilir enerji üretimidir. Biyodizel, biyogaz ve biyoetanol dünyada yapılan çalışmalar kapsamında farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Biyodizel çalışmalarında yenilebilir kaynak (gıda olarak kullanılan ham maddeler) kullanımı ve üretimden sonra kalan çözücü problemi nedeniyle, araştırmacılar daha temiz bir enerji olan hidrojen enerjisi ile ilgilenmektedir. Hidrojen enerjisi kimyasal yöntemlerle üretilebilmesine rağmen, biyohidrojen üretimi maliyet, uygulanabilirlik ve sürdürülebilirlik açısından daha verimlidir. Biyohidrojen üretimi, esas olarak fermantasyon ve fotoliz olmak üzere iki yöntemle gerçekleştirilir. Bu yöntemler ışık ve ışıktan bağımsız olarak sınıflandırılır. Biyolojik yöntemlerle hidrojen üretimi olmasıyla birlikte, biyohidrojen üretim yöntemlerinde tüm bakteri veya mikroalg türleri kullanılamaz. Closteridum, mor bakteriler, mikroalgler, siyanobakteriler, sırasıyla karanlık fermantasyon, foto-fermantasyon, direkt fotoliz ve indirekt fotolizde kullanılan biyolojik türlerdir. Bu türler çevre dostu enerji ve karbon negatif enerji kaynağı olduğu için fosil yakıt yerine kullanılabilecek enerji kaynağı olarak görülmektedir. Ayrıca, bu türlerin enerji kaynağı olarak kullanılmasıyla, yenilebilir kaynakların tükenmesi ve ekilebilir arazinin gereksiz kullanımı önlenecektir. Hidrojen üretiminin birçok avantajı olmasına rağmen, yeni çalışma alanı olduğu için büyük ölçekli üretim sınırlıdır. Ticari hidrojen üretimi ise gelecekte biyolojik endüstriyel atıklar ile yapılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** biyohidrojen, mikroorganizma, fermantasyon, biyofotoliz

## Comparison and feasibility of biohydrogen production methods from microorganisms

**Abstract**

One of the important points in combating climate change and air pollution is the production of renewable energy. Biodiesel, biogas, and bioethanol are produced from different sources within the scope of studies conducted in the world. Because of the problem of using edible resources in biodiesel studies and remaining solvent after production, the researchers have interested in cleaner hydrogen energy. Although hydrogen energy can be produced by chemical methods, biohydrogen is more efficient in terms of cost, applicability, and sustainability. Biohydrogen production is carried out by two methods, mainly fermentation and photolysis. These methods are classified according to light and light-independent. Although there is hydrogen production by biological methods, not all bacteria or microalgae species can be used in all methods. Closteridum, purple bacteria, microalgae, cyanobacteria are biological species used in dark fermentation, photo-fermentation, direct photolysis, and indirect photolysis, respectively. Since these species are environmentally friendly energy and carbon-negative energy source, it is seen as an energy source that can be substituted for fossil fuel. Also, by using these species as energy sources, the depletion of edible resources can be prevented and unnecessary use of arable land will be avoided. Although hydrogen production has many advantages, it is limited in large scale production because it is the new studying area. Commercial hydrogen production can be made with biological industrial wastes in the future.

**Keywords**: biohydrogen, microorganisms, fermentation, biophotolysis

## GİRİŞ

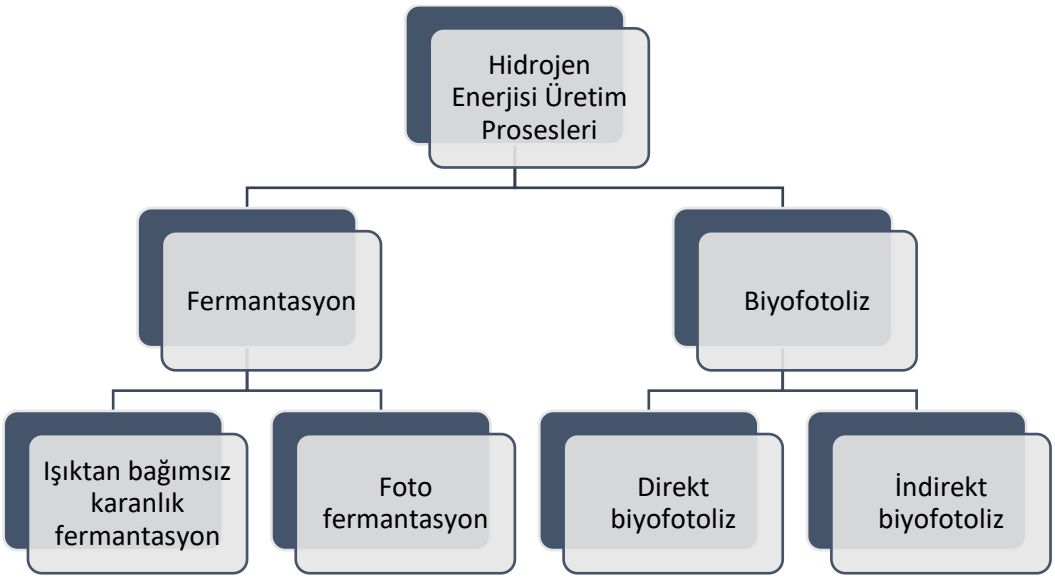
Sanayileşme nedeniyle katlanarak artan enerji talebi karşılanırken, kullanılan enerji kaynağı hava kirliliğine neden olmamalıdır. Karbon negatif yakıt olan hidrojen enerjisi yakın zamanda yenilenebilir enerji kaynakları arasında yer almıştır. Günümüzde birçok araştırmacı yaptığı çalışmalar soncunda hidrojen enerjisinin fosil yakıtların yerini alabileceğini ve farklı kaynaklardan verimli bir şekilde üretilebileceğini göstermiştir. Hidrojen gazı doğada bol miktarlarda bulunan bir gaz olup aynı zamanda laboratuvarda biyolojik proseslerle üretilebilmektedir. Ayrıca, diğer enerji kaynaklarına kıyasla yüksek enerji verimliliğine (122 kJ / g) sahiptir.

Bununla birlikte, düşük üretim verimliliği, pahalı üretim süreçleri ve hidrojen enerjisinin depolanmasındaki zorluklar önemli dezavantajlardan bazılarıdır (Kapdan & Kargi, 2006). Hidrojen gazının üretiminde petrol arıtımı, kömür gazlaştırması ve doğal gazın buharlaştırılması gibi çeşitli prosesler vardır. Bu prosesler kimyasal bazlıdır ve yüksek sıcaklıklar gerektirir. Ancak, biyo-fotoliz, fotofermentasyon, karanlık fermantasyon ve hibrit sistemler gibi biyolojik prosesler, çalışmalarda ucuz ve kolay kullanım avantajları ile ön plana çıkmaktadır (Khetkorn et al., 2017). Biyolojik proseslerin kullanımındaki en kritik adım, mikroalgler ve siyanobakteriler gibi mikroorganizmaların hidrojenaz ve nitrojenaz enzimleri üretmeleri için çevresel koşulların sağlanmasıdır (Vargas et al., 2016). Mikrobiyal türler yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirirken enzimler biyolojik olarak salınmaktadır. Fotosentetik bakteriler salgıladıkları enzimleri fotosentez sırasında kullandığından enzimler oksijene duyarlıdır. Bu enzimlerin oksijene duyarlılığı nedeniyle sistem kontrolü zordur (Show et al., 2018).

Hidrojen enerjisinin üretimi şimdilik küçük ölçekli laboratuvar çalışmaları ile sağlanabilmektedir. Hidrojen üretimi yeni çalışma konusu olduğundan, maksimum hidrojen üretimi için optimum koşullar belirlenmemiştir. Bu olgulara dayanarak, yapılan çalışma farklı biyohidrojen üretim yöntemlerinin karşılaştırılmasına odaklanmaktadır.

## BİYOHİDROJEN ÜRETİM PROSESLERİ

Biyohidrojen üretiminde kullanılan dört yöntem vardır ve Şekil l'de gösterildiği gibi bu yöntemlerde su bir substrat olarak kullanılmaktadır. Hidrojen enerjisi esas olarak fermantasyon ve fotoliz yöntemleri ve bunların modifikasyonları ile üretilmektedir. Clostridium, mor bakteriler, mikroalgler ve siyanobakteriler biyohidrojen üretiminde farklı yöntemlerde kullanılmaktadır (Bolatkhan et al., 2019). Örneğin, mikroalgler doğrudan fotoliz yönteminde kullanılırken, siyanobakteriler indirekt fotoliz yönteminde kullanılır.




Şekil 1. Hidrojen enerjisi üretim metotları(Bolatkhan et al., 2019)

### Fermantasyon

#### a. Işıktan bağımsız karanlık fermantasyon yöntemi

Karanlık fermantasyon yöntemi, ışığa ve oksijene bağlı bir yöntem olmadığı için uygun maliyetli biyohidrojen üretim yöntemidir. Karanlık fermantasyon yönteminde genelde anaerobik bakteriler kullanmasına rağmen, ışık gerektirmeyen mikroalg türleri de kullanılabilmektedir. Bu yöntem, organik asitli yan ürünler ürettiği ve karbon kaynaklarını substrat olarak kullandığı için yenilenebilir enerji üretiminde önemli yöntemlerden biridir. Ancak sistemde toksik maddeler varsa, enerji üretim verimliliği çok düşüktür. Ayrıca sistemde $CH_4$, $H_2S$ ve CO gazları üretilmektedir. Fermantasyon sonucunda açığa çıkan kalıntının çevreye zarar vermemesi için

arıtılmalıdır (Elbeshbishy et al., 2017; Guwy et al., 2011; Rai & Singh, 2016). Işıktan bağımsız koyu fermantasyon reaksiyonu;

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 2H_2 + 6CO_2$$

$$Pyruvate + CoA \rightarrow acetly - CoA + formate$$

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 12H_2 + 6CO_2$$

**b. Foto-fermantasyon yöntemi**

Karanlık fermantasyon yönteminden farklı olarak, foto fermantasyon yönteminde biyohidrojen üretimi yüksek verimle elde edilir. Foto fermantasyon yöntemiyle biyohidrojen üretimi, mor bakteri gibi fotosentetik mikroorganizmalar ile organik substratın hidrojene dönüştürülmesiyle gerçekleştirilir (Kumar et al., 2017; Redwood et al., 2009). Hidrojen üretiminin foto-fermantasyon yöntemi ile reaksiyonu aşağıdaki denklemde verilmektedir;

$$CH_3COOH + 2H_2O + light \rightarrow 4H_2 + 2CO_2$$

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

Bazı fotoheterotrofik bakteriler, organik maddeleri aydınlatma ve anaerobik koşullar varlığında hidrojene dönüştürebilir. Biyohidrojen üretimi piruvat anaerobik metabolizmasına dayanmaktadır. Foto fermantasyon yönteminin önemli avantajı, atıklardan üretilen organik substratları tüketebilmesi, dezavantajı ise ışık alabilen geniş alanlar gerektirmesidir.

**Biyofotoliz**

**a. Direkt biyofotoliz**

Biyohidrojen üretimi, güneş enerjisininin kimyasal enerjiye dönüştürülerek elde edildiği için bu yöntem alglerde meydana gelen fotosentez işlemine benzemektedir. Mikroalgler aerobik koşullarda biyohidrojen üretebildiği gibi anaerobik koşullarda hidrojen üretebilir. Hidrojen enerjisi üretim aşamalarından biri, karbondioksitin azaltılması için indirgeyici üretimdir ve diğeri, fotosentez işlemlerinde suyun ayrışmasıdır (Azwar et al., 2014; biochemistry & 1995, n.d.; da Silva Veras et al., 2017). Direkt fotoliz yöntemi ile hidrojen üretim reaksiyonunun denklemi aşağıda verilmektedir;

$$2H_2O + Fd_{(ox)} + ışık \rightarrow O_2 + 4H + Fd_{(red)(4e^-)}$$

$$4H^+ + Fd_{(red)(4e^-)} \rightarrow 2H_2 + Fd_{(ox)}$$

Yeşil bitkilerden biyohidrojen üretilememesinin nedeni hidrojenaz enziminin eksikliğidir. Bu nedenle yeşil bitkiler fotosentezle sadece karbondioksiti azaltabilir. Direkt biyofotoliz yönteminin substrata ihtiyaç duyulmaması, substrat olarak suyun kullanılması ve yüksek teorik enerji verimliliği gibi avantajları vardır. Bununla birlikte, hidrojenaz enziminin oksijene duyarlılığı, sistemdeki hidrojen üretimini sınırlaması da önemli dezavantajdır.

**b. İndirekt biyofotoliz**

Mikroalgler ve siyanobakteriler indirekt biyofoliz yönteminde kullanılan biyolojik türlerdir. Bu yöntemde, depolanan glikojen ve nişasta bakteriler tarafından hidrojene dönüştürülür. İndirekt biyofoliz iki aşamadan oluşur; ışık altında fotofermantasyon yöntemi ile karbonhidratın sentezlenmesi ve sentezlenen karbonhidrattan hidrojen üretimi. Biyohidrojen enerjisi mikroalglerden üretilebilmesine rağmen, fotosentez etkinliğininin

arttırılmasının zor olması nedeniyle fotosentez yapabilen bitkilerden hidrojen üretimi oldukça sınırlıdır (Kapdan & Kargi, 2006). İndirekt biyofoliz yönteminin eşitliği aşağıda verilmiştir;

$$N_2 + 8H^+ + Fd_{(red)(8e^-)} + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + Fd_{(ox)} + 16ADP + 16Pi$$

İndirekt biyofotolizin en önemli avantajları, basit bir mekanizma olması ve hidrojenin sudan üretilebilmesidir. Bununla birlikte, yüksek ışık gereksinimi ve enerji maliyeti bu yöntemi kullanmanın dezavantajlarıdır.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda enerjinin %70' inden fazlası yakıt olarak kullanılmaktadır. Bakterilerden ve mikro alglerden hidrojen enerjisi üretimi, gelecek için yenilenebilir enerji üretimi oldukça umut vericidir. Güneş enerjisi kullanılarak yetiştirilebilen mikroalglerden biyohidrojen elde etmek zor olmasına rağmen, sera gazı emisyonlarının azaltılmasında önemli rol oynayacak bir yöntemdir. Önümüzdeki yıllarda teknoloji ve araştırmaların geliştirilmesi sayesinde hidrojen enerji üretim verimliliğine maksimum seviyelere ulaşılabilir. Hidrojenaz ve nitrojenaz enzimlerinin oksijen hassasiyetinin azaltılması, mikroalglerle endüstriyel atıksu arıtımı ve alg çamurunun enerji kaynağı olarak kullanılması ticari hidrojen üretimi için önemli ekonomik yaklaşımlardır. Hidrojen enerjisi üretimindeki zorlukların yanı sıra, araştırmacıların depolama sorunlarının üstesinden gelmeleri gerekmektedir. Biyohidrojen üretiminde verimliliği artırmak ve problemleri tanımlamak ve çözmek için multidispliner çalışmaları yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

Azwar, M. Y., Hussain, M. A., & Abdul-Wahab, A. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 31, pp. 158–173). Pergamon. https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022

biochemistry, Y. M.-P., & 1995, undefined. (n.d.). Hydrogen production by biophotolysis based on microalgal photosynthesis. *Elsevier*. Retrieved April 4, 2020, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0032959295870016

Bolatkhan, K., Kossalbayev, B. D., Zayadan, B. K., Tomo, T., Veziroglu, T. N., & Allakhverdiev, S. I. (2019). Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives. *International Journal of Hydrogen Energy*, *44*(12), 5799–5811. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.092

da Silva Veras, T., Mozer, T. S., da Costa Rubim Messeder dos Santos, D., & da Silva César, A. (2017). Hydrogen: Trends, production and characterization of the main process worldwide. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 42, Issue 4, pp. 2018–2033). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.219

Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 79, pp. 656–668). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075

Guwy, A. J., Dinsdale, R. M., Kim, J. R., Massanet-Nicolau, J., & Premier, G. (2011). Fermentative biohydrogen production systems integration. *Bioresource Technology*, *102*(18), 8534–8542. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.051

Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*(5), 569–582. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015

Khetkorn, W., Rastogi, R. P., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Madamwar, D., Pandey, A., & Larroche, C. (2017). Microalgal hydrogen production – A review. *Bioresource Technology*, *243*, 1194–1206. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.085

Kumar, G., Sivagurunathan, P., Pugazhendhi, A., Thi, N. B. D., Zhen, G., Chandrasekhar, K., & Kadier, A. (2017). A comprehensive overview on light independent fermentative hydrogen production from wastewater feedstock and possible integrative options. *Energy Conversion and Management*, *141*, 390–402. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.087

Rai, P. K., & Singh, S. P. (2016). Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 41, Issue 44, pp. 19957–19971). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.084

Redwood, M. D., Paterson-Beedle, M., & MacAskie, L. E. (2009). Integrating dark and light bio-hydrogen

production strategies: Towards the hydrogen economy. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 8, Issue 2, pp. 149–185). Springer. https://doi.org/10.1007/s11157-008-9144-9

Show, K. Y., Yan, Y., Ling, M., Ye, G., Li, T., & Lee, D. J. (2018). Hydrogen production from algal biomass – Advances, challenges and prospects. *Bioresource Technology*, *257*(February), 290–300. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.105

Vargas, J. V. C., Kava, V., Balmant, W., Mariano, A. B., & Ordonez, J. C. (2016). Modeling microalgae derived hydrogen production enhancement via genetic modification. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(19), 8101–8110. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.217

# Biyodizel üretiminde kullanılan çeşitli kaynakların enerji verimliliğinin ve sürdürülebilirliğinin değerlendirilmesi

Ayşe Elif Ateş[1*]

[*1]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: elifdenizler@istanbul.edu.tr

## Özet

Artan enerji talebini karşılamak için sanayiciler ve araştırmacılar yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelmiştir. Biyodizel kolay kaynak ulaşımı, yüksek miktarlarda üretilebilmesi, depolama kolaylığı gibi avantajları nedeniyle fosil yakıtların yerini alabilecek enerji kaynağı olarak görülmektedir. Biyodizel üretimi temelde serbest yağ asitlerinin katalizör eşliğinde alkolle reaksiyona girmesi sonucunda elde edilmektedir. Biyodizel üretimi sırasında reaksiyon yan ürünü olarak birçok alanda ham madde olarak kullanılabilen gliserin açığa çıkmaktadır. Biyodizel üretim veriminin artırılabilmesi için uygun katalizörün kullanımı ve alkol:yağ oranı önemlidir. Biyodizel kaynakları olarak yenebilir yağlı tohumlar, yenebilir olmayan atık yemeklik yağlar ve mikroalgler kullanılabilmektedir. Palm, kanola ve mısır gibi yenebilir olan kaynakların biyodizel üretiminde kullanılması durumunda tarıma elverişli arazilerin ve bu ürünlerin yetiştirilmesi için yüksek miktarlarda su kullanımını gerektirmektedir. Araştırmacılar yağlı tohumların kaynak olarak kullanılması yerine bertarafı zor olan atık yemeklik yağların daha verimli şekilde değerlendirilmesi için biyodizel üretiminde kullanmışlardır. Atık yağların biyodizel üretiminden önce rafine edilmesi gerekliliği maliyeti yükselttiği için son dönemlerde mikroalgler yakıt kaynağı olarak kullanılmaktadır. Mikroalgerin büyütülmesinde tarıma elverişli arazinin kullanımına ihtiyaç olmaması, atıksu arıtımında kullanılabilmeleri, mikroalg türlerine göre biyodizel üretim veriminin artırılabilmesi gibi yakıt kaynağı olarak kullanımında önemli avantajları vardır. Bu çalışma biyodizel üretiminde kullanılan kaynakların yağlarının yakıt özelliklerini ve biyodizel üretim verimlerine odaklanmıştır. Çalışma kapsamında bu kaynaklarının sürdürülebilirlikleri değerlendirilmiştir. Yenebilir ve yenebilir olmayan kaynaklara kıyasla mikroalglerin biyodizel kaynağı olarak kullanımında biyodizel üretim verimi yapılan araştırmalar sonucunda %75 olarak bulunmuştur. Bu oranın diğer kaynaklara göre az miktarda düşük olmasına rağmen avantajlarının fazla olması araştırmacılar tarafından mikroalglerin kaynak olarak kullanımı daha verimli görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** biodizel, mikroalg, sürdürülebilirlik

# Assessment of various resources used in biodiesel production; energy efficiency and sustainability

## Abstract

Industrialists and researchers are interested in renewable energy sources to meet the increasing energy demand. Biodiesel is seen as an energy source that can replace fossil fuels due to its advantages such as easy resource access, high yields and ease of storage. Biodiesel production is mainly obtained by reacting free fatty acids with alcohol in the presence of catalyst. During the production of biodiesel, glycerin, which can be used as a raw material in many areas as a transesterification reaction by-product, is released. In order to increase biodiesel production efficiency, the use of appropriate catalyst and alcohol: oil ratio is important. Edible (oilseeds), non-edible (waste cooking oils), and microalgae can be used as biodiesel sources. When edible resources such as palm, canola, and corn are used in biodiesel production, it requires high amounts of water for the cultivation of arable land and these crops. Instead of using oil seeds as a source, the researchers are used in biodiesel production for more efficient evaluation of waste edible oils, which are difficult to dispose of. Since the need to refine waste oils before biodiesel production increases the cost, microalgae have been used as a fuel source recently. It has important advantages in the use of fuel as such as the without using arable land for growing microalgae, their use in wastewater treatment, and the increase of biodiesel production efficiency according to microalgae species. This study focuses on the fuel properties of oils used in biodiesel production and biodiesel production efficiencies. The sustainability of these resources was assessed within the scope of the study. Compared to edible and non-edible sources, biodiesel production efficiency was found to be 75% in the use of microalgae as a biodiesel source. Although this rate is low compared to other sources, it has been found that the advantages of microalgae as a source are more productive by the researchers.

**Keywords:** biodiesel, microalgae, sustainability.

## GİRİŞ

Günümüzde dünyada kullanılan toplam enerjinin %80'inden fazlası fosil yakıtlar tarafından sağlanmaktadır. Kullanılan yakıtın yol açtığı yüksek oranlarda sera gazı emisyonu nedeniyle çevre ve sağlık sorunlarına ciddi katkıları vardır. Giderek kötüleşen hava kirliliği nedeniyle daha temiz enerji üretim teknolojisi bilinci küresel olarak artmaktadır (Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2018). Son zamanlarda araştırmacılar fosil yakıtlara alternatif olabilecek kaynakları kapsamlı bir şekilde araştırmaktadır. Yapılan çalışmalarda biyodizel üretimi geleneksel yakıtların yerine kullanılabilir dikkate değer sonuçlar vermiştir (Veljković et al., 2018). Biyodizel üretiminde bitkisel sıvı ve katı yağlar gibi yenilenebilir biyolojik kaynakların kullanılabilirliği geniş ölçüde gözden geçirilmiştir. Petrole kıyasla güvenilir, yenilenebilir, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilir ve kükürt içermemesi gibi birçok avantajı vardır. Biyodizelin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendiğinde parlama noktasının petrol dizelden veya benzinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Buna ek olarak kalorifik değeri 37.27 $MJL^{-1}$ olup petrol dizelin kalorifik değerinden yaklaşık %9 daha düşüktür (Tablo 1) (Abbaszaadeh et al., 2012).

**Tablo 1.** Biyodizel (B100) yakıt kalite standartları (Abbaszaadeh et al., 2012)

| Özellikler | Metot | Sınır | Birim |
|---|---|---|---|
| Parlama noktası | D93 | Min. 93 | °C |
| Su ve tortu | D2709 | Max. 0,05 | %hacim |
| Kinematik viskozite, 40 °C | D445 | 1.9-6 | $mm^2/s$ |
| Sülfatlanmış kül | D874 | Max. 0.02 | % kütle |
| Kükürt S 15 sınıfı | D5453 | Max. 0,0015 | % kütle (ppm) |
| Kükürt S 500 sınıfı | D5453 | Max. 0,05 | % kütle (ppm) |
| Bakır şerit korozyonu | D130 | No Max 3 | - |
| Setan sayısı | D613 | 47 min | - |
| Donma noktası | D2500 | - | °C |
| Karbon kalıntısı | D4530 | Max. 0,05 | % kütle |
| Asit sayısı | D664 | Max. 0,5 | mgKOH/g |
| Serbest gliserin | D6584 | 0,02 | % kütle |
| Toplam gliserin | D6584 | 0,24 | % kütle |
| Fosfor içeriği | D4951 | Max. 10 | ppm |
| Vakum damıtma uç noktası | D1160 | Max. 360 | °C |
| Soğuk emiş filtrasyonu | D6751 | Max. 360 | s |

Biyodizel karıştırma, katalitik ayırma ve transesterifikasyon gibi farklı proseslerden geçerek üretilmektedir. Karıştırma işlemi petrolün biyodizelle karıştırılması işlemidir. Bu yöntemle elde edilen yakıt motora zarar veren serbest yağ asidine sahip olup oksitlenmiş yakıt artığı oluşması gibi sorunlara yol açmaktadır. Bu sorunların ortadan kalkması için büyük ölçeklerde farklı kaynakları kullanarak biyodizel üretimi çalışmaları yapılamaktadır. Bu kaynaklara mikroalgler, kanola, palm, hindistan cevizi örnek verilebilir. Biyodizel kaynakları literatürde yenebilir olan, yenebilir olmayan ve diğer kaynaklar olarak sınıflandırılmaktadır, Tablo 2'de gösterilmektedir (Verma & Sharma, 2016).

**Tablo 2.** Çeşitli biyodizel kaynaklarının sınıflandırılması

| Yenebilir kaynaklar | Yenebilir olmayan kaynaklar | Diğer kaynaklar |
|---|---|---|
| Soya fasülyesi | Mikroalgler | Atık yemeklik yağ |
| Ay çekirdeği | Tespih ağacı tohumu | Hayvansal iç yağ |
| Palm | Kauçuk | Balık yağı |
| Hindistan cevizi | Bodur ağaç | Tavuk yağı |
| Kanola | Millettia pinnata bitkisi | Rafine edilmiş atık yemeklik yağ |

## TRANSESTERİFİKASYON

Transesterifikasyon yöntemi kısaca yağ moleküllerinin (trigliserit) baz katalizörü eşliğinde alkolle reaksiyona girerek biyodizele ve gliserine dönüşümü olarak tanımlanır. Biyodizel/gliserin dönüşümünde biyodizel verimini artırmak için transesterifikasyon sırasında optimum oranda katalizörün (asit veya baz gibi kimyasallar veya enzimler) kullanılması gerekmektedir. Bununla birlikte, biyodizel, süperkritik koşullar altında katalitik olmayan yöntemle de üretilebilir. Transesterifikasyon, trigliseritin yağ asitleri ve gliserole parçalandığı üç ardışık ve geri dönüşümlü reaksiyon serisidir. Açığa çıkan yağ asitleri metanol ile reaksiyona girer ve metil esterler (biyodizel) üretir (Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2018).

## ÇEŞİTLİ BİYODİZEL KAYNAKLARINDAN ELDE EDİLEN YAKITLARIN ÖZELLİKLERİ

Bitkisel yağların doğrudan yakıt olarak kullanılamamalarının nedeni yüksek viskoziteye sahip oldukları için motorda kullanıma uygun olmamasıdır. Viskozitelerinin ayarlanması transesterifikasyon reaksiyonu ile gerçekleştirilmektedir. Tablo 3' de çeşitli kaynaklardan elde edilmiş biyodizelin özellikleri verilmiştir. Tablo incelendiğinde atık yemeklik yağın yüksek asitlik değerine/ FFA(serbest yağ asitleri) sahip olduğu görülmektedir. Bunun gibi ham maddelerin değerlerinin ayarlanması için iki aşamalı taransesterifikasyon uygulanmaktadır. Bitkisel yağın yakıt olarak kullanılması durumunda kalorifik değerlerin düşük olduğu görülmektedir. Buna rağmen bitkisel yağların parlama noktaları biyodizelin parlama noktasından yüksek olması depolama kolaylığı açısından önemli bir avantajdır (Issariyakul & Dalai, 2012; S Jain et al., n.d.; Siddharth Jain et al., 2011; Kumar et al., n.d.; Nautiyal et al., n.d.).

**Tablo 3.** Çeşitli yağların yakıt özellikleri ve biyodizel üretim verimleri

| Yağlar | Yoğunluk ($kg/m^3$), 40 °C | Viskozite, 40 °C | Parlama noktası, °C | Kalorifik değer, Mj/kg | Asit değeri | %FFA | Biyodizel üretim verimleri, % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Atık yemeklik yağ | 937 | 50 | 235 | 38.27 | 43.46 | 21.84 | 90.6 |
| Palm yağı | 881-919 | 39.4 | 252-256 | - | 0.1 | - | 88 |
| Ayçiçeği yağı | 922.2 | 33.4 | - | - | 0.5 | - | 91 |
| Yer fıstığı yağı | 900 | 22.73 | 271 | 39.8 | 3 | - | 90 |
| Mısır yağı | 910 | 34.9 | 277 | 39.5 | - | - | 87 |
| Hint yağı | 929 | 247.51 | 325 | - | 4.57 | 2.3 | 68.3-87.30 |
| Mikroalg | 860 | 5.66 | 130 | 41.36 | 0.45 | - | 75 |
| Pirinç yağı | 913-920 | 35.29-43.52 | 280-316 | - | 4.78 | 2.4 | 35-95 |
| Petrol dizel | 820-860 | 3.5-5 | 60-80 | 42-45 | - | - | - |

## BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANILAN KAYNAKLARIN SÜRDÜRÜLEBİLİRLİĞİ

Geçmişte ve günümüzde biyodizel üretiminde kullanılan yenebilir ve yenebilir olmayan çeşitli kaynaklar bulunmaktadır. İlk jenerasyon biyodizel üretimi daha çok kanola, palm, mısır ve ayçiçeği gibi gıda olarak kullanılabilen kaynaklar kullanılmıştır. Bu kaynakların geniş çaplı biyodizel üretiminde kullanılabilmesi için oldukça fazla tarıma elverişli arazinin kullanımı ve bitkilerin yetiştirilebilmesi içinde su tüketimi gerekmektedir. Tarımsal arazide yetiştirilen yağlı tohumların kaynak olarak kullanımı, üretimi, ekstraksiyonu biyodizel üretimini kolaylaştırmış olmasına rağmen bu tohumların pazar payındaki yerini yükselterek fiyat artışına sebep olmuştur. Bu durum nedeniyle ikinci jenerasyon biyodizel olarak araştırmacılar sürdürülebilir kaynak arayışında bulunmuş ve yemeklik atık yağların kullanımına başlanmıştır. Restoranlardan ve yemekhanelerden bertarafı zor olan atık yağların enerjiye dönüşümü çalışmaları 'atıktan enerji (waste to energy)' hız kazanmıştır. Atık yağlardan biyodizel üretimi çalışmaları incelendiğinde biyodizel veriminin yağlı tohumlardan biyodizel üret,m verimine kıyasla düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca transesterifikasyon reaksiyonu öncesinde atık yağın rafine edilmesi, biyodizel üretimi sonrası açığa çıkan kalıntının bertaraf öncesi arıtılması gibi maliyeti artırabilecek dezavantajları vardır. Son yıllarda hem maliyeti düşük hemde çevre dostu kaynak olarak mikroalgelerin kullanımıyla üçüncü jenerasyon biyodizel üretilmiştir. Mikroalgelerin kullanımının önemli avantajları yetiştirilmesi için tarıma elverişli arazilerin kullanımının gerekli olmaması, $CO_2$' nutrient olarak kullanabilmesi, atıksu arıtımında kullanılabilmesi ve üretim maliyetinin düşük olmasıdır. Fakat, atıksu bazlı mikroalg yetiştirme verimi atıksu bileşiminde bulunan toksik kirlenme ve ışık geçirgenliğini engelleyen askıda katı madde bulunması nedeniyle sınırlıdır. Mikroalg türlerinde yağ oranları %40-80 arasında farklılık göstermektedir. Bu nedenle biyodizel üretim verimi kullanılacak olan mikroaglerin türüne göre değişiklik göstermektedir. Basit hücre yapısına sahip mikroalgler karasal bitkilerle kıyaslandığında yaklaşık 15 kat $CO_2$ dirimsel tutturma verimine sahiptir (Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2018). Mikroalgal biyodizel pazarının piyasaya sürülmesi, geleneksel alg ürünleri pazarlarını da etkileyebilir. Bu yeni pazarın kozmetik ve kimyasallar gibi konvansiyonel uygulamaları artırıp artırmayacağına dair somut bir kanıt yoktur.

## SONUÇ

Biyodizel üretimi dünya çapında farklı kaynaklarla yapılmıştır. Üretim açısından zorluk olmamasına karşın sürdürülebilir kaynaklar kullanılarak üretimin yaygınlaştırılması ve teşvik edilmesi önemlidir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde mikroalglerden üretilen üçüncü jenerasyon biyodizelin üretim veriminin farklı mikroalg türleri kullanılarak artırılabildiği görülmüştür. Alglerin büyümesi için optimum ortam şartlarının sağlanması ve büyük miktarlarda yetiştirilebilecek şekilde ekimi ve hasadının geliştirilmesi gerekmektedir. Kısa sürede gerekli miktarda biyodizel üretmek için genetik olarak mühendislik türlerinin büyümesinde daha fazla ilerleme ve daha az enerji kullanımı gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., Omidkhah, M. R., & Najafi, G. (2012). Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, *63*, 138–148. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.02.027

Issariyakul, T., & Dalai, A. K. (2012). Comparative kinetics of transesterification for biodiesel production from palm oil and mustard oil. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, *90*(2), 342–350. https://doi.org/10.1002/cjce.20679

Jain, S, technology, M. S.-B., & 2010, undefined. (n.d.). Kinetics of acid base catalyzed transesterification of Jatropha curcas oil. *Elsevier*. Retrieved April 12, 2020, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410008709?casa_token=a6fX7truxTMAAAAA:nSw3yf-xORH2Dk7iNhKdbCCyixUdpe_Dm1ODZnJXftvO3V2RVfdC7bhgFRqUlruuBNAxUmEqmRjQ

Jain, Siddharth, Sharma, M. P., & Rajvanshi, S. (2011). Acid base catalyzed transesterification kinetics of waste cooking oil. *Fuel Processing Technology*, *92*(1), 32–38. https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.08.017

Kumar, R., Tiwari, P., Fuel, S. G.-, & 2013, undefined. (n.d.). Alkali transesterification of linseed oil for

biodiesel production. *Elsevier*. Retrieved April 12, 2020, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236112003456?casa_token=YO10aTzASW0AAAAA:PmLPv5x551VA2zq_LRS1YJnw6Xn8hEEomOBQAYPwmqPUicsmkDZz9tNedesa8AtxNhmTuGSLrihv

Nautiyal, P., Subramanian, K., Fuel, M. D.-, & 2014, undefined. (n.d.). Kinetic and thermodynamic studies on biodiesel production from Spirulina platensis algae biomass using single stage extraction–transesterification process. *Elsevier*. Retrieved April 12, 2020, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236114006292?casa_token=81osJFcrbxQAAAAA:EK7pQpmTMh8ZReTrMs7ysomp3B9ukCIf7B9Um_7cJlD0-BJamN82qPYT_iu9jGSVT_Qo8mVgcslf

Sivaramakrishnan, R., & Incharoensakdi, A. (2018). Microalgae as feedstock for biodiesel production under ultrasound treatment – A review. *Bioresource Technology*, *250*(November 2017), 877–887. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.095

Veljković, V. B., Biberdžić, M. O., Banković-Ilić, I. B., Djalović, I. G., Tasić, M. B., Nježić, Z. B., & Stamenković, O. S. (2018). Biodiesel production from corn oil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *91*(April 2017), 531–548. https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.024

Verma, P., & Sharma, M. P. (2016). Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *62*, 1063–1071. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.04.054

# Karasu Kent Merkezinin Çevresel Gürültü Düzeyinin Saptanması

Özgür YERLİ*[1], Adem GENÇ[2]

[1]Düzce Üniversitesi, Orman Fakültesi, Peyzaj Mimarlığı Bölümü,Düzce,Türkiye
[2]Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Peyzaj Mimarlığı ABD,Düzce,Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: ozguryerli@duzce.edu.tr

## Özet

Günümüzde teknolojinin, endüstrinin, ulaşım araçlarının gelişmesi ve artmasıyla birlikte Türkiye'de ve Dünyada, gürültü önemli bir çevre, yaşam ve sağlık sorunudur. Gürültüyü insanlar üzerinde olumsuz etki yaratan, istenmeyen, hoşa gitmeyen rahatsız edici ses topluluğu olarak ifade etmek mümkündür. Gürültü haritaları, özellikle hızlı kentleşme sürecinde hem doğal kaynakların hem de kent insanın yaşam kalitesini arttırmak amacıyla kent planları için önemli bir veridir. Çalışma kapsamında; Karasu belediyesi mücavir alan sınırları içerisinde konut, sanayi, ticaret, turizm merkezi, yeşil alan gibi farklı kullanımlarda ve çevresel gürültünün en büyük sebeplerinden olan, karayolları ulaşımı sağlayan ana arterlerde belirlenen 84 noktada on iki ay boyunca gürültü ölçümleri yapılmıştır. Çalışmanın amaçları, belediye mücavir alan sınırı içerisinde on iki ay boyunca yapılan ölçümler sonucunda kentin gürültünün izin verilen değerleri geçen ve izin verilen değerlere yaklaşan bölgelerinin tespitinin yapılması, mevsimlere göre gürültü haritalarının oluşturulmasıdır. Bunun için elde edilen gürültü değerlerinin mevsimler açısından istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir. Gürültü ölçümleri Svantek 971 model ölçüm cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Esri ArcGIS 10.1 yazılımı kullanılarak enterpolasyon yöntemi ile gürültü haritaları oluşturulmuştur. Sonuç olarak gürültünün ana sebebinin tarafikten kaynaklandığı, gürültünün izin verilen değerleri aşan bölgelerde, ilçeleri bir birine bağlayan İstanbul ve Ankara Caddeleri üzerinde olduğu görülmüştür. Karasu kent merkezinde gürültünün mevsimlere göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. En yüksek değerler yaz mevsiminde ölçülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Gürültü, Gürültü Harita, Kent, Karasu, Mevsim

# Determination Of The Environmental Noise Level Of Karasu City Center

## Abstract

Nowadays, technology, industry, together with developments in Turkey and the increase in transport and in the world, an important environmental noise is an issue of life and health. It is possible to express the noise as an undesirable and unpleasant discomforting sound group that has negative effects on people. Noise maps are important data for urban plans in order to improve the quality of life of both natural resources and urban people, especially during the rapid urbanization process. Scope of work; Noise measurements were made for 84 months at 84 points identified in the main arteries providing access to highways in different uses such as housing, industry, trade, tourism center, green area and within the boundaries of Karasu Municipality. The aim of the study is to determine the regions of the city which exceed the permissible values of the noise and approach the permissible values as a result of the measurements carried out for twelve months within the boundary of the municipality, and to create noise maps according to the seasons. For this purpose, statistical analysis of the obtained noise values for seasons was performed. Noise measurements were carried out with Svantek 971 meter. The data obtained were interpolated by using Esri ArcGIS 10.1 software. As a result, the main reason of the noise is due to the neutrality, the noise exceeds the permissible values in the regions, which connects the districts on one of the Istanbul and Ankara Street was found. Noise in Karasu city center It was found that according to the seasons. The highest values were measured in summer

**Keywords:** Noise, Noise Map, City, Karasu, Season

## GİRİŞ

Günümüzde Türkiye'de ve Dünya'da endüstri,teknoloji ulaşım araçlarının gelişmeşi nüfusun artmasıyla birlikte gürültü kirliliği büyük sorun haline gelmiştir. Morgül ve Dal 2012;Kandemir ve ark.2018.Gürültü genel anlamda istemeyen,hoşa gitmeyen tahammülü kolay olmayan ses olarak ifade edilir;su, toprak, hava kirliliğinden sonra gelen kirleticidir.( Erdoğan ve ark.,2014;Bayraktar 2006;Avşar ve ark.1999)

Gürültünün insan üzerindeki etkilerinin 55–60dB düzeyinde oluşmaya başladığı 65dB düzeyinden sonra sağlık sorunluları ve davranış bozukluklarının meydana geldiği belirtilmektedir.(Tekalan 1996).Gürültünün insan üzerindeki etkilerini ise fizyolojik ve psikolojik rahatsızlıklar;stres, uykusuzluk, huzursuzluk, kontrasyon eksikliği, performans düşüklüğü, sinirlilik, işitme kaybı, kalp ritminde düzensizlik şeklinde sıralanabilir. (Bayramoğlu ve ark., 2014,Güler ve Çobanoğlu 1994,Sygna ve ark., 2014, Clark ve Stansfeld, 2007, Babisch 2008, Rylander 2004) Bilim insanı Robert Koch 1910 yılında "Günün birinde insanlar, aynen kolera ve vebada olduğu gibi gürültüyle mücadele etmek zorunda kalacaklardır" demiştir (Kalıpcı 2007)

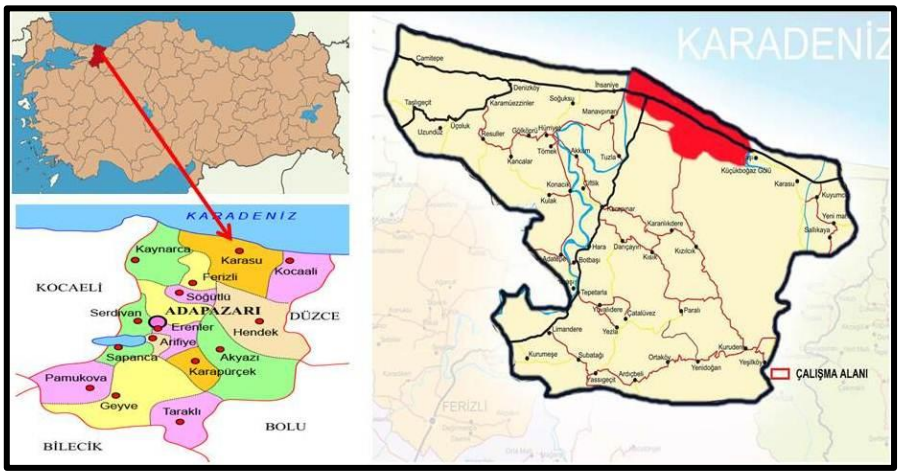
Yaşadığımız veya çalıştığımız alanlarda bizi etkileyen gürültülerin bir bölümü; yapı içinde bir bölümünü yapı dışından kaynaklanmaktadır Kaynak ve alıcıların çevresel konumlarına ve gürültünün yayılma yollarına bağlı olarak çevre gürültüleri iki grupta incelenmektedir.(Kurra 2009)Yapı içi çevre gürültüleri;İç mekânlarda oluşan komşuluktan kaynaklı; müzik, Tv, kapı çarpması, çocuk ağlaması veya asansör, jeneratör, ışıtma soğutma sistemlerinden kaynaklı doğan gürültü türleri örnek verilebilir.(Deveci 2004, Kurra 2009)Yapı dışı gürültüler;Yapı dışı çevre gürültüleri;ulaşım, endüstriyel, yapı(inşaat) ve insan ve etkilerinden doğan, eğlence ve ticaret amaçlı gürültüler olarak dört grupta sınıflandırılabilir.(Kurra 2009)

Yerli ve yabancı bir çok araştırmacı gürültü üzerine çalışma yürükmektedir.Kılıç ve Abuş (2018), Bayramoğlu (2014), Merchan (2014), parklardaki gürültü kirliliği; (Urban ve Maca, 2013) gürültü ve insan üzerine etkileri; Yerli ve ark., (2019) ,Li ve ark., (2019), Kavraz (2015), Zannin ve ark., (2013)Kampüs gürültü kirliliği; Önder ve Gülgün (2010), Doygun ve Doygun (2018), gürültü kirliliğinde bitkisel perdeleme; Taşkaya ve Sesli (2018), King ve Rice (2009),gürültü haritalarının oluşturulması; Kalansuriya (2009), Rahmani (2011),Öden ve Bilgin (2019),Kandemir ve ark., (2018) trafik ulaşım gürültüsü;Yerli (2012) gürültü haritalarının oluşturulması ve alternatif çözüm örnekleri üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Çalışma kapsamında Karasu İlçe merkezinde bir yıl boyunca yapılan ölçümler sonucunda mevsimlere ait gürültü haritalarının oluşturulması,haritaların yorumlanması,gürültü değerleri aşan noktaların tespiti,mevsimler değerleri arasında anlamlığın yorumlanması şeklinde çalışma sonuçlandırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmanın ana materyali Sakarya İli Karasu Belediyesinin 14,58 km2 uygulama imar planları sınırında bulunan Aziziye, İncili, Kabakoz, Kuzuluk, Yalı ve Yeni mahalle oluşturmuştur. Çalışma alanı sınırı ait görüntü şekil 1'de yer almaktadır. Çalışmanın temelinin oluşturan gürültü ölçümleri Svantek 971 model gürültü ölçüm cihazıyla gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 1.**Çalışma alanına ait görüntü.

Karasu Belediyesi mücavir alan sınırları konut, sanayi, ticaret, turizm merkezi, yeşil alan gibi mevcut alan kullanımlarına sahip bir bölgedir. Bu farklı kullanımlarında ve çevresel gürültünün sen büyük sebeplerinden olan karayolları ulaşımı sağlayan ana arterlerde belirlenen 84 noktadan oluşan gürültü ölçüm ağı oluşturulmuştur. Bu amaç kapsamında 2018 yılı mart ayı ve 2020 yılı şubat aylarını kapsayacak bir yıl boyunca her ay içerisinde gürültü ölçümleri yapılmıştır. Literatürde araştırmacılar, gürültü miktarını tespit etmek amacıyla 3 ve 1 dakikalık ölçümler yapmışlardır.Bayramoğlu ve ark., (2014) ;Yerli (2012); Kang and Zhang (2010).Eşdeğer gürültü seviyeleri (Leq) her bir noktada iki dakika boyunca, Çevresel Gürültünün Değerlendirilmesi ve Yönetimi Yönetmeliği'ne göre gündüz; 07:00'dan 19:00'a saatleri zaman diliminde yapılmıştır.

Haritaların oluşturulması amacıyla Esri ArcGIS yazılımı ve Spatial Analyst eklentisinde bulunan enterpolasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem bir çok bilimsel çalışmada yer verilmiş; Nas ve Berktay (2001) yeraltı suyu sertlik haritalarının oluşturulmasında, Akbaş ve Yıldız (2004) toprak haritalarının oluşturulmasında, Payan ve Ertürk (2002) hava kirliliği haritalarının oluşturulmasında, Morova ve ark.(2010) Isparta'da yaptıkları kampüs gürültü kirliliği haritalarını CBS ortamında IDW enterpolasyon yöntemiyle oluşturmuştur. Yerli (2012) Düzce'de kentsel alan kullanımından kaynaklı gürültü haritalarını oluşturmada, Aditya ve ark. (2010) Hindistan'da yaptıkları çalışmada, Tsai ve ark. (2009) Tayvan'da yaptıkları çalışmada gürültü haritalarını CBS ortamında kriging metodu ile oluşturmuşlardır.

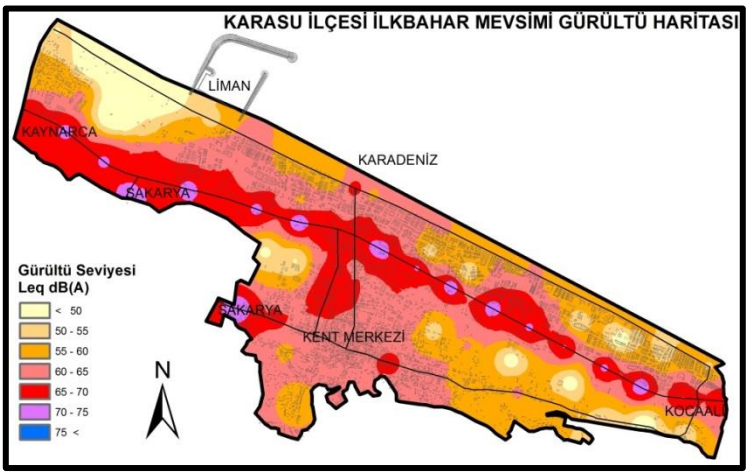
Her aya, mevsime ve yıl ortalamasına ait gündüz ve akşam gürültü değerlerinin istatistiksel analizi için SPSS paket programı kullanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak EşleştirilmişGruplar T Testi (Paired Samples T Test) uygulanmıştır. Ural ve Kılıç (2005)'a göre bu test, bir grubun veya örneklemin bir değişkene ait iki farklı zamandaki ölçümlerine ilişkin ortalamaların karşılaştırılarak, söz konusu ortalamalar arasındaki farkın belirli bir güven düzeyinde önemli olup olmadığını test etmek için kullanılmaktadır.

Mevsimlere ait gürültü haitaları oluşturulması, aylık gürültü değerlerinin ortalaması alınarak oluşturulmuştur.Mevsimlik gürültü haritalarının oluşturulma sebebi; gürültü değerlerine ait farklılıkların net ortaya konulması, özellikle kenttin yaz aylarında turizmden kaynaklı geçici nüfus değişiminin gürültü değerleri üzerindeki etkinin net olarak ortaya konulmasında yardımcı olmaktadır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

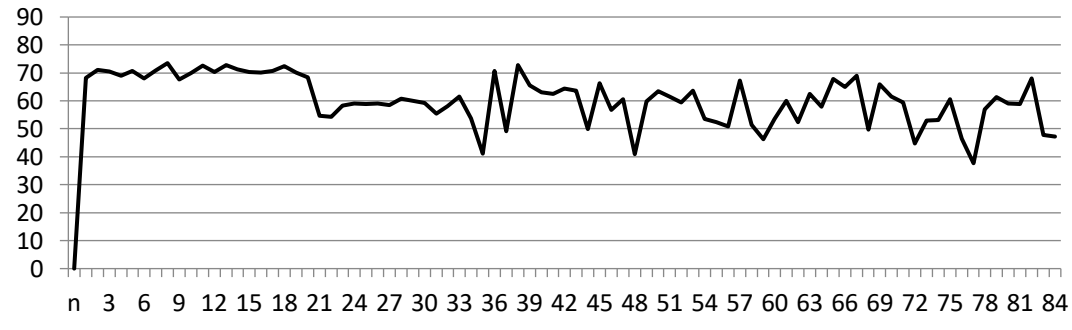
### İlkbahar Mevsim Gürültü Değerleri

İlkbahar mevsiminde yapılan ölçümler sonucunda en düşük değerler 37,70 dB(A) ile Deniz Feneri ve Liman Arasında ölçülmüştür. İlkbahar mevsiminde yapılan ölçümler sonucunda en yüksek değerler 73,50 dB(A) ile İstanbul Cad. Gümüştaş Beton Santrali Girişinde ölçülmüştür. İlkbahar mevsimine aitgürültü haritası şekil 2'de görülmektedir.




**Şekil 2.** İlkbahar mevsimine ait gürültü haritası

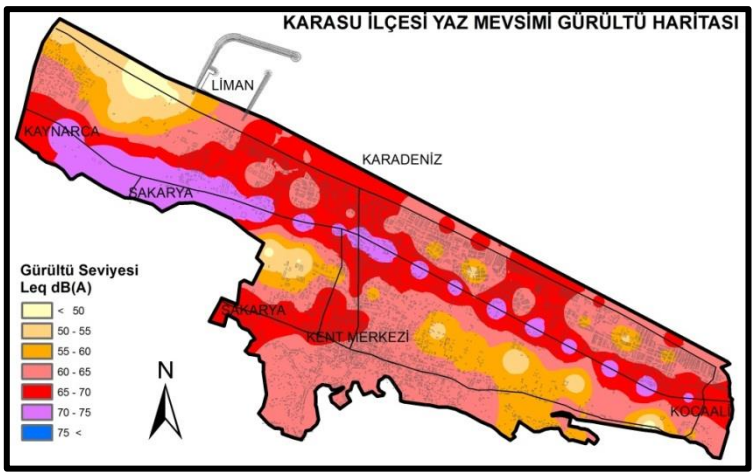
İlkbahar mevsimine ait gürültü grafiği şekil 3'de verilmiştir.İlkbahar-Yaz mevsimi arasındaki istatistiksel analize bakıldığında değerler arasında anlamlı düzeyde farklılığın olduğu (t: -8,002***p<0,001) görülmüştür.




**Şekil 3.** İlkbahar mevsimine ait gürültü grafiği

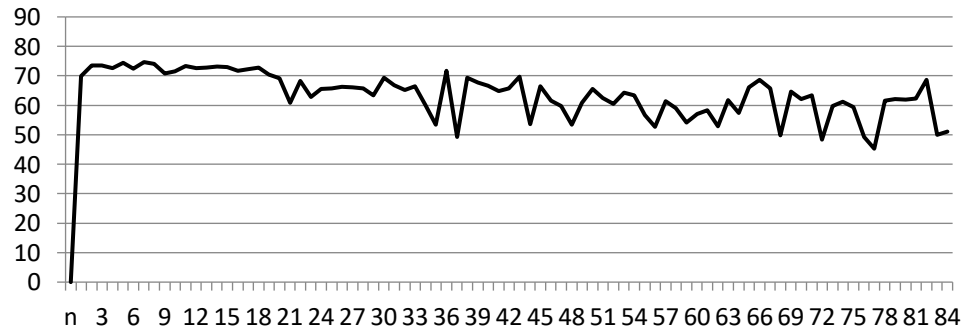
## Yaz Mevsimi Gürültü Değerleri

Yaz mevsiminde yapılan ölçümler sonucunda en düşük değerler 45,33 dB(A) ile Deniz Feneri ve Liman Arasında ölçülmüştür. Yaz mevsiminde yapılan ölçümler sonucunda en yüksek değerler 74,67 dB(A) ile İstanbul Cad. Balcı Fırını Önünde, ölçülmüştür.Yaz mevsimine ait gürültü haritası şekil 4'de görülmektedir.




**Şekil 4.** Yaz mevsimine ait gürültü grafiği

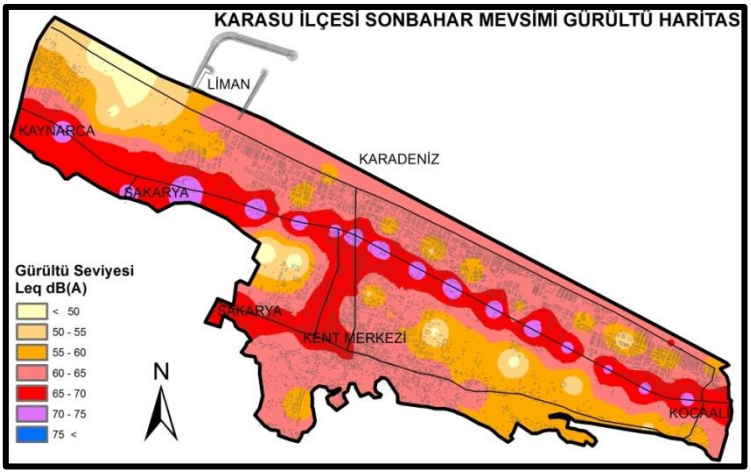
Yaz mevsimine ait gürültü grafiği şekil 5'de verilmiştir.Yaz-Sonbahar mevsimi arasındaki istatistiksel analize bakıldığında değerler arasında anlamlı düzeyde farklılığın olduğu (t: 6,953***p<0,001),görülmektedir.




**Şekil 5.** Yaz mevsimine ait gürültü grafiği

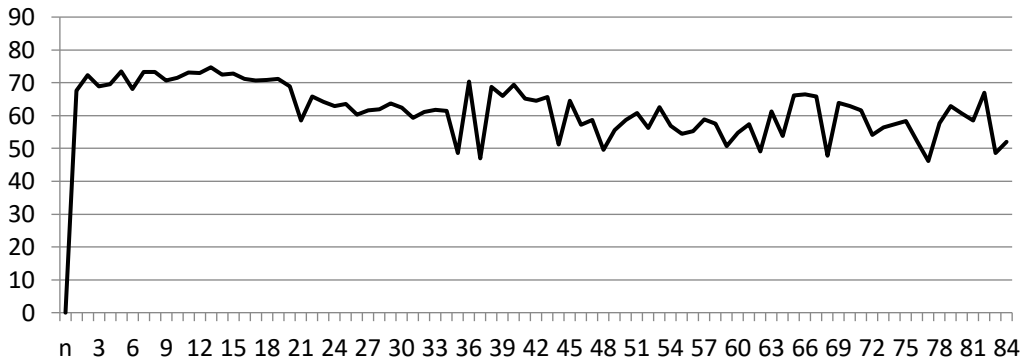
## Sonbahar Mevsimi Gürültü Değerleri

Sonbahar mevsiminde yapılan ölçümler sonucunda en düşük değerler 46,10 dB(A) ile Deniz Feneri ve Liman Arasında ölçülmüştür. Sonbahar mevsiminde yapılan ölçümler sonucunda en yüksek değerler 74,70 dB(A) ile Ankara Cad. Seferoğlu Araç kiralama önünde ölçülmüştür. Sonbahar mevsimine ait gürültü haritası şekil 6'de görülmektedir.




**Şekil 6.** Sonbahar mevsimine ait gürültü haritası

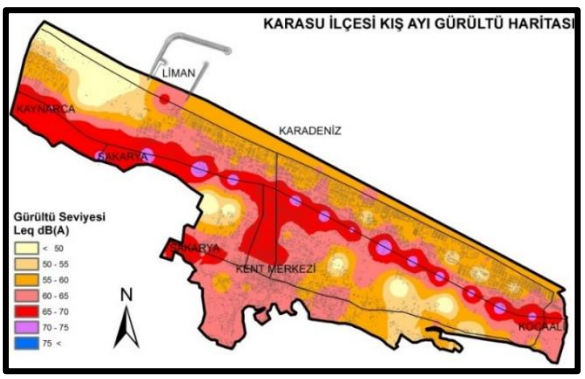
Sonbahar mevsimine ait gürültü grafiği şelil 7'de verilmiştir.




**Şekil 7.** Sonbahar mevsimine ait gürültü grafiği

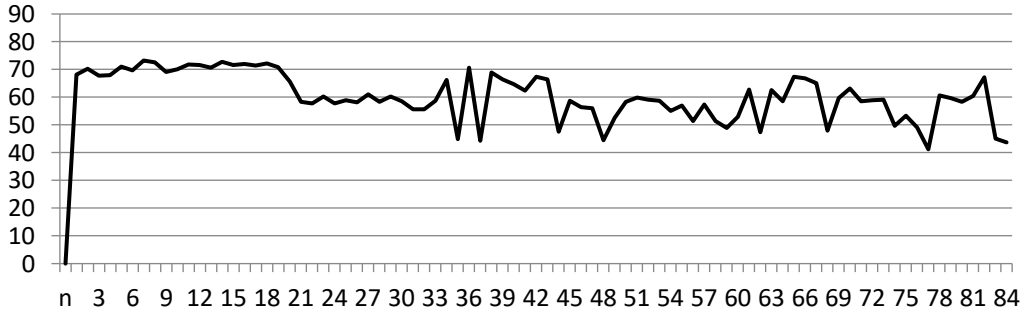
## Kış Mevsimi Gürültü Değerleri

Kış mevsiminde yapılan ölçümler sonucunda en düşük değer 41.20 dB(A) ile Deniz Feneri ve Liman Arasında ölçülmüştür. Kış mevsiminde yapılan ölçümler sonucunda en yüksek değerler 73.23 dB(A) ile İstanbul Cad. Balcı fırını önünde ölçülmüştür. Kış mevsimine ait gürültü haritası şekil 8'de görülmektedir.




**Şekil 8.** Kış mevsimine ait gürültü haritası

Kış mevsimine ait gürültü grafiği şekil 9'daverilmiştir.Kış - Yaz mevsimi arasındaki istatistiksel analize bakıldığında değerler arasında anlamlı düzeyde farklılığın olduğu (t: -8,077***p<0,001),görülmektedir.




**Şekil 9.** Kış mevsimine ait gürültü grafiği

**Mevsimler Arası Gürültü Farkı**

Mevsimler arasındaki gürültü miktarı değişiminin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla ikili mevsim grupları arasında Eşleştirilmiş Gruplar T Testi istatistiksel analiz yöntemi uygulanmıştır.84 ölçüm noktasının değerlerine ilişkin istatistiksel analiz sonuçları çizelgede yer almıştır.

Mevsim ortalamalarının birbirleriyle karşılaştırıldığında Kış – İlkbahar mevsimleri arasında gürültü farklarının istatistiksel olarak açıklanamadığı Tablo 1'de görülmüştür.Bunun dışında tüm mevsim değerlerine ait gürültü farkları istatistiksel olarak açıklanmıştır.Çizelgeye bakıldığında mevsimler arasındaki gürültü farkı incelendiğinde en yüksek farkın Kış- Yaz ayları arasında (ort:-8,077), en az farkın İlkbahar-Sonbahar ayları arasında (ort:-3,691) olduğu görülmüştür.Çizelgedeki analiz sonucunda gürültü miktarının mevsimlere göre anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği görülmektedir.

**Tablo 1.**Mevsimler arası gürültü değişiminin istatistiksel analizi

| | Eşleşmiş Farklılıklar | | | | | t | Serbestlik Derecesi | Anlam |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ortalam | Standart Sapma | Standart HataOrt. | Farkın %95 güven aralığı | | | | |
| | | | | Azalan | Artan | | | |
| **İlkbahar - Yaz** | **-3,18036** | **3,64274** | **,39746** | **3,97088** | **-2,38983** | **-8,002** | **83** | **,000** |
| Kis - İlkbahar | -,17548 | 3,66863 | ,40028 | -,97162 | ,62067 | -,438 | 83 | ,662 |
| **İlkbahar-Sonbahar** | **-1,38131** | **3,43000** | **,37424** | **-2,12567** | **-,63695** | **-3,691** | **83** | **,000** |
| **Yaz-Sonbahar** | **1,79905** | **2,37139** | **,25874** | **1,28442** | **2,31367** | **6,953** | **83** | **,000** |
| **Kis - Yaz** | **-3,35583** | **3,80792** | **,41548** | **-4,18220** | **-2,52946** | **-8,077** | **83** | **,000** |
| **Kis- Sonbahar** | **-1,55679** | **2,89215** | **,31556** | **-2,18442** | **-,92915** | **-4,933** | **83** | **,000** |

**SONUÇ**

Gürültü ölçümleri ve yapılan analizler sonucunda Karasu Kent merkezinde bir çok noktasında gürültü farklılıkları bulunmaktadır.Gürültü haritaları incelendiğinde en yüksek gürültü değerlerinin ulaşım aksları etrafında şekillendiği görülmektedir. Kent içindeki ana arterler özellikle gürültünün en fazla ölçüldüğü alanlardır. Ulaşım akslarını yoğun olmadığı bölgelerde gürültü miktarları da düşmektedir. Ulaşım yoğunluğu ile gürültü miktarı arasında doğrudan bir ilişki gözlenmiştir.Gürültü haritaları incelendiğinde gürültü değerlerinin en düşük olduğu alanlar, özellikle yapı yoğunluğunun az yada hiç olmadığı bölgeler göze çarpmaktadır.Gürültü haritaları incelendiğinde alanın kuzey bölümünde ki gürültü farkının en büyük sebepleri yaz aylarındaki günübirlik ve geçici nüfustan kaynaklığı olduğu gözlenmiştir Çalışmanın sonuçlarına göre yaz

mevsimi değerlerinin kış mevsimine göre yaklaşık 5-10 dB(A) daha fazla olduğu görülmüştür.Gürültü değerleri yapılan analizler sonucu kentteki gürültü değerlerinin en yüksek olduğu ay Temmuz ayı olarak görülmektedir.Yapılan analizler sonucunda "gürültü miktarı mevsimler arası farklılık göstermektedir" hipotezlerini doğrulamıştır.

## KAYNAKLAR

Aditya S., Yadav, G., Biswas, S., Traffic noise mapping, GIM International, 24(6) (2010).

Akbaş F., Yıldız H., Toprak özelliklerinin haritalanmasında jeoistatistiksel tekniklerin kullanımı,3. Coğrafi Bilgi Sistemleri Bilişim Günleri, İstanbul, 6-9 Ekim (2004).

Avşar, Y., Arslankaya, E., Gönüllü, M.T., 1999. Barbaros Bulvarı Gürültü Düzeyi Tesbit Çalışması,. Türkiye'de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu III, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 1009-1015

Bayramoğlu, E., Özdemir, I.B., Demirel, Ö. 2014. Gürültü Kirliliğinin Kent Parklarına Etkisi ve Çözüm Önerileri: Trabzon Kenti Örneği. İnönü Üniversitesi Sanat ve Tasarım Dergisi, 4(9): 35–42.

Bayraktar Ş., İzmit kent merkezinin gürültü kirliliği, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, (2006).

C. Clark C. ve Stansfeld S.A, "The effect of transportation noise on health and cognitive development:a review of recent evidence", International Journal of Comparative Psychology, 20(2), 2007.

Deveci S., Edirne İlinde Gürültü Düzeylerinin Belirlenerek Gürültü Haritalarının Oluşturulması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi, 2004.

Doygun,N.,Doygun H. Trafik Gürültüsünün Kontrolünde Bitki Perdelerinden Yararlanılması Üzerine Bir Araştırma, KSÜ Tarım ve Doğa Derg 21(4):599-606, 2018

Güler Ç. ve Çobanoğlu Z., Gürültü, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, 1994

Kalansuriya, C. M., Pannila, A. S., Sonnadara, D. U. J., 2009. Effect of roadside vegetation on the reduction of traffic noise levels. Proceedings of the Technical Sessions, Institute of Physics – Sri Lanka, 25, 1-6.

Kalıpcı, E., 2007. Giresun İl Merkezinde Gürültü Kirliliği Ölçümü ve Haritasının Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi,. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.

Kandemir, S.Y.,Çerçevik,A.E.,Yıldız, M.,Çelik, M. Bilecik İli Şehir İçi Yollardan Kaynaklı Gürültü Kirliliğinin Ölçülmesi ve Değerlendirilmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, (366-374),2018

Kang, J., Zhang M. 2010. Semantic Differential Analysis of the Soundscape in Urban Open Public Spaces. Building and Environment, 45: 150-157.

Kavraz, M. 2015. Gürültü Düzeylerinin İç Mekanlar Açısından Değerlendirilmesi - KTÜ Kanuni Kampüsü Örneği. Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 3: 597-601.

Kılıç Y.M.,Abuş M.N.,2018 Kent Parklarındaki Gürültünün Değerlendirilmesi: Hüdavendigar Parkı Örneği, Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Cilt 8, Sayı 3,109-117,

King, E.A., Rice, H.J., 2009. The Development Of A Practical Framework For Strategic Noise Mapping. Applied Acoustics, 70: 1116-1127

Kurra S., Çevre Gürültüsü Ve Yönetimi, Bahçeşehir Üniversitesi Yayınları, İstanbul, (2009)

Li, F., Wu, M., Lai, C., Chen, S., Xu, Y., Du, C., Cai, M., Liu, J. 2019. A Maximum Noiselevel Prediction Method For High-Speed Railways In China: A Case Study Using The Baiyun Campus Of Guangdong Polytechnic Normal University. Applied Acoustics 150: 124–131

Merchan, C.I., Diaz-Balteiro, L., Solino, M., 2014. Noise Pollution In National Parks: Soundscape And Economic Valuation. Landscape And Urban Planning, 123: 1-9

Morgül Ve Dal 2012 Sakarya İli Şehir Merkezinin Gürültü Kirliliği Üzerine Bir Ön Çalışma

Morova, N., Şener, E., Terzi, S., Beyhan, M., Harman, B. İ. 2010. Süleyman Demirel Üniversitesi Yerleşkesinin Gürültü Haritalarının Coğrafi Bilgi Sistemleri Ile Hazırlanması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 14: 271-278.

Nas B. Ve Berktay A., Coğrafi Bilgi Sistemleri (Cbs) Kullanılarak Konya Kenti Yeraltısuyu Sertlik Haritasının Oluşturulması, Coğrafi Bilgi Sistemleri Bilişim Günleri, İstanbul, (2001).

Öden K.M., Bilgin İ.,2019 Sarayönü İlçe Merkezinde Trafik Kaynaklı Gürültü Kirliliğinin Araştırılması, Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi Cilt 34, Sayı 1,103-114,

Önder,S.,Gülgün B.,2010 Türk Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Ve Vakfı, Sayı: 355,54-60

Payan F. Ve Ertürk F., So2ve Nox Kirleticilerinin 1995-1996 Kış Sezonunda Bursa Için Hava Kirliliği Haritalarının Oluşturulması, Ekoloji, 11 (45) (2002) 14-17.

Rahmani, S., Mousavi, S.M., Kamali, M.J., 2011. Modeling of road-traffic noise with the use of genetic algorithm.Applied Soft Computing, 11: 1008-1013.

Rylander R., 2004"Physiological aspects of noise-induced stress and annoyance", Journal of Sound and Vibration, cilt 277, pp. 471–478.

Sygna K., Aasvang G. M., Aamodt G., Oftedal B. ve Krog N. H.,2014"Road traffic noise,sleep and mental health", Environmental Research, cilt 131, pp. 17–24.

Taşkaya, S., Sesli, F.A. Elazığ İli Mevcut Stratejik Gürültü Haritalarının Anket Çalışması İle İrdelenmesi, Kent Akademisi | Kent Kültürü ve Yönetimi Hakemli Elektronik Dergi | Cilt: 11 Sayı: 3.444-458,2018

TEKALAN, S.A., 1996"Gürültünün İşitme ve Diğer Sistemler Üzerine Etkisi", Ekoloji ve Çevre Dergisi, 1 - 11.

Tsai K.T., Lin M.D., Chen Y.H.,2009 Noise mapping in urban environments: A Taiwan Study, Applied Acoustic, 70-964-972

Ural A. ve Kılıç İ., Bilimsel Araştırma Süreci ve SPSS ile Veri Analizi, Detay Yayıncılık, Ankara, 2005.

Urban, J.,Maca, V., 2013. Linking Traffic Noise, Noise Annoyance and Life Satisfaction: A Case Study. International Journal of Environmental Research and Public Health, International Journal of Environmental Research and Public Health10(5):1895-1915

W. Babisch W., "Road traffic noise and cardiovascular risk", Noise Health, cilt 10, pp. 27-33, 2008.

Yerli Ö. Kentsel Alan Kullanım Kaynaklı Gürültünün Düzce Kenti örneğinde İrdelenmesi Doktora Tezi, Düzce Üniversitesi, (2012).

Yerli Ö.,Genç A.,Kaya E.2019,Düzce Üniversitesi Konuralp Yerleşkesi Çevresel Gürültü Profilinin Değerlendirilmesi,Düzce Üniversitesi Ormancılık Dergisi 15 (2):126-136

Zannin, P. H T., Engel, M. S., Fiedler, P. E. K., Bunn, F. 2013. Characterization of environmental noise based on noise measurements, noise mapping and interviews: A case study at a university campus in Brazil. Cities, 31: 317-327.

# The role of the capping agents on the inorganic nano-pigment synthesis

Fatma Tugce SENBERBER[1*]

[*1]Nisantasi University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Civil Engineering, Istanbul, Turkey.

*Corresponding author e-mail: fatma.senberber@nisantasi.edu.tr

## Abstract

Inorganic metal oxides are commonly stable to high temperatures and chemicals. This makes them useful in the colourization step of the ceramic sector. The particle shape and size gain important with the recent development in printing technology. The preparation procedure of synthesized particles can affect the particle shape and size. The effectivity of the inorganic compounds can be improved by the optimization of particle morphology and size. The capping agents are the basic components to control the morphological properties. These molecules are classified according to the centre atom and different types of capping agents can be used for each different experimental setup. In the use of capping agents on the inorganic nano-pigment preparation, nanoparticles at homogeneous morphology can be achieved. The interaction between the capping agent and the nucleus determines the growth of the particle mechanism.

**Keywords:** capping agent, inorganic pigment, nano-pigment, printing technology.

## INTRODUCTION

Pigments are the insoluble solid particles in the solvents or binders that determine the chromatic property of dye and help to its solidification. They are classified as inorganic, organic and metallic pigments. Inorganic pigments preferred in the ceramic sector are thermally and chemically stable at high temperatures and exhibit high colour performances. The common examples of inorganic pigments are spinel, zircon, corundum and rutile that can be used in colourization of ceramics, plastics and transparent films (Kürkçü 2013; Özel 2004). Some examples of inorganic ceramic pigments are presented in Figure 1.




**Figure 1.** Some examples of inorganic ceramic pigments a. $Cr_2O_3$ (Darani et al., 2017), b. $V_xZr_{1-x}O_2$ (Calatayud and Alarken, 2017), c. $CoAl_2O_4$ (Rajabi et al., 2019)

The colour performance, crystallinity, particle shape and size of pigments are essential characteristic to determine their quality. These characteristics will affect their printing and applications. Recent printing technology is based on two main methods:

- Analog printing that includes the use of micro-structured inks
- Digital printing (ink-jet printing or 3D printing) that includes the use of nano-structured inks (Rajan et al., 2016)

The critic points in ink-jet printing are rheologic, electrical and magnetic characteristics, surface tension, zeta potential, particle size and shape of pigment and stability of pigment in the solvent. Since the traditional pigments in micron-scale could cause congestion in nozzles, new production designs of pigment and dye are required. The particle size of the pigment should be lower than 1µm for the ink-jet printing. With this purpose,

several sorts of pigments have been developed such as organo-metallic pigments, micronized pigments, colloidal pigments, and nano-pigments (Dondi et al., 2012).

## Inorganic Nano-Pigments

The coatings involving the nano-pigments showed higher chromatic features than the coatings prepared using the micro-pigments. The size and shape of the particles can gain novel and notable properties to the obtained material. This makes the preparation and control of nano-particle and nano-pigments essential. Because of the higher surface area of nano pigments, they have the properties of higher coverage and higher reflectivity. For example; the colour of red, green and orange can be prepared at the particles sizes of using gold in the spherical shape at 25, 50, and 100 nm, respectively. The shade of light yellow can observe by using Ag particles at 100 nm while the blue colour can be seen by using the Ag particles 40 nm (Darani et al., 2017, Nejad et al., 2011).

Nano pigments can be fabricated by using different methods: Pechini, co-precipitation, hydrothermal, sol-gel, polyol, supercritical, combustion [ref]. Particle size and shape can be affected by reaction temperature and time, the stoichiometric ratio of starting materials, pre-treatment before reaction, pH and chemical additives. The chromatic and optical features of synthesized pigment is related to its crystallographic features.

## CAPPING AGENTS

Capping agents are the essential components that are added liquid medium to control the particle size and shape. In recent years, there a gradually increase in the usage of capping agents and modifiers in the liquid-state reactions. Surfactants, ligands polymers, dendrimers, cyclodextrins and polysaccharides can be used with this aim. These organic ligands modify the metal surface, provide the efficient dispersion, prevent agglomerations of nano-particles and increase the compatibility of the phases (Campisi et al., 2016). Capping agents are the amphiphilic molecules that include a polar head group and an apolar hydrocarbon group. The function of the capping agent is based on these polar-apolar groups. The apolar group interact with the liquid medium, while the polar group reacts with the metal ion to form the nanostructure (Gulati et l., 2007).

### Mechanism

The interaction between the metal surface and capping agent is based on the electrical attraction between the interfaces, composition, steric features of surface and chemical features of ligand (Campisi et al., 2016). Particle formation in solution-based synthesis generally involves two processes: nucleation and growth. In an experimental procedure, the surfactant or the capping agent can affect both of the processes. It is possible to control the particle shape and size by using the capping agents. The addition of surfactants as capping agents could prepare a draft for the nucleus formation. Therefore, the length of the capping agent molecule may affect the critical nucleus radius.

The growth of the particle in solution occurs with two steps: diffusion from cluster to particle surface and the bonding and/or reaction between ion – solid particles. The diffusion or reaction rate can be controlled by using the reaction parameters (Phan et al. 2017).

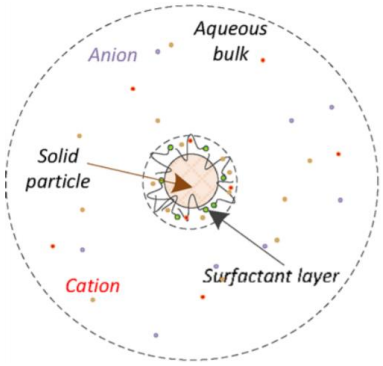



***Figure 2.*** *Nano-particle formation (Phan et al. 2017)*

The typical effect of the capping agent on the nucleus growth mechanism of $Fe_2O_3$ is presented in Figure 2. FeO(OH) is formed by the hydrolysis of the chlorides and nitrates of $Fe^{+3}$ (Eq. 1). Colloidal FeO(OH) particles

transform the stabile $Fe_2O_3$ phase (Eq. 2). During this phase replacement, the particle size can be edited by the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) addition.

$Fe^{+3} + 5H_2O \leftrightarrow FeO(OH) + 3H_3O^+$ (1)

$2FeO(OH) \leftrightarrow Fe_2O_3 + H_2O$ (2)

The capping agent acts as a barrier in transferring ions on the surface of the synthesized particle. However, it is possible the partial transfer of the ions in solution can. The size of the obtained particle is related to the selectivity of the capping agent. When the selectivity of the agent is low, the mass transfer will also be low. This means that the growth of the particle will be limited. Two main factors affect the mass transfer between particle and solution are the adsorption/desorption in the bulk - surfactant system and the connection of surfactant to the solid surface (Phan et al. 2017).

## Classification

The capping agents involve the functional groups that can bind the surface of nanoparticles. These polar group carboxylate groups, amino groups or some coordinating atoms like the heteroatoms. According to the determined capping agent, the prepared sample can gain hydrophilic features (Arulmozlhi and Mythili, 2013). Neutral molecules or anions bound to the ligand centre are defined as “donor atom”. Capping agents are classified according to the nature of the donor atom (Gulati et al., 2007):

- N-terminated ligands are the organic compounds that involve the donor atom of N such as hexadecyl amine, (HDA), octadecylamine, (ODA), oleyamine, (oAm) and pyridine. They are generally preferable in metal oxide nanoparticles for their liquid state at room conditions, low cost and stability in colloidal solutions.
- O-terminated ligands are the organic compounds that involve the donor atom of O such as oleic acid and linolenic acid. The acid reacts with the double bond or is absorbed by carboxylate of the nanoparticle.
- P-terminated ligands are the organic compounds that involve the donor atom of P such as tri-n-octylphosphene oxide (TOPO) and tri-n-octylphosphine (TOP). There are commonly used with organo-metallic starting materials in hot injection preparation methods.
- S-terminated ligands are the organic compounds that involve the donor atom of S such as 1-thioglycerol. They are generally hydrophilic molecules.
- Green ligands are organic compounds such as biodegradable polymers, polyphenols, citric acid and enzymes. There can be prepared from different plant extracts such as green tea or leaves of aromatic plants.

## THE EFFECTS OF CAPPING AGENTS ON THE NANO-SCALE CERAMIC PIGMENTS

The agglomerations of particles could affect the physical, chemical and biological properties of synthesized compounds. For this reason, the capping agents can be used as stabilizers or modifier to prevent the aggregations.

Aruzmolhi and Mythili examined the effects of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), CTAB and oleic acid on the characteristics of synthesized PbO particles. The results showed that the use of oleic acid increased the hydrophobicity of compound and the particle size were decreased with the capping agent addition. Oleic acid was suggested as the best fitted capping agent for the nano-PbO synthesis (Arulmozhi and Mythili, 2013).

Latha et al., produced the CTAB capped and sodium docecyl benzene sulfonate (SDBS) capped $In_2O_3$ particles. Both of the capping agents successfully decreased the particles sizes lower than 20 nm. In SDBS capped particles were in shape of spherical clusters, while spherical particles were observed in CTAB capped samples. It was also indicated that SDBS capping increased the porosity (Latha et al., 2017).

Javed et al., preferred the capping agents of polyethylene glycol (PEG) and polyvinyl pyrrolidone (PVP) to prepare nanoparticles of ZnO. The biological activities of capped samples increased and particle sizes

decreased to 26 nm. According to the results, the highest antioxidant activities were observed at PEG capped samples (Javed et al., 2016).

Izu et al., prepared cerium oxide ($CeO_2$) by using the hydroxyl propyl cellulose (HPC) instead of PVP. The particle size of synthesized particles is about to 90 nm. The morphology is similar to each other for the capping agents (PVP and HPC). (Izu et al., 2009).

Saket et al., fabricated Au including magenta ceramic pigments at different chromatic properties by using the organic ligand of glucose and (PVP) and different pH control agents of NaOH and $NH_4OH$. The highest red colour was obtained in the use of NaOH as a reducing agent and the lowest particle sizes were obtained in the use of capping agents (Saket et al., 2016).

Rangappa et al., synthesized the $CoAl_2O_4$ nano-pigments in supercritical conditions. The synthesized particles exhibit transparency in hexane solutions. The capping agents used in the experiments were oleic acid and decanoic acid (Rangappa et al., 2007). Torkien and Daghihi investigated the effect of ß-alanine ($C_3H_7NO_2$) on the colour performance of spinel. Effect of ß-alanine on the colour performance of spinel was presented in Figure 3. The results indicated that the addition of ß-alanine prevented the agglomeration and increased the colour performance of the sample (Torkien and Daghihi, 2014). Khademolhoseini and Talebi produced the spherical shape nano $CoAl_2O_4$ particles with the use of lactose as a capping agent in a sol-gel method. The synthesized particles used as a photocatalyst in the degradation methyl orange under the UV light (Khademolhoseini and Talebi, 2016).

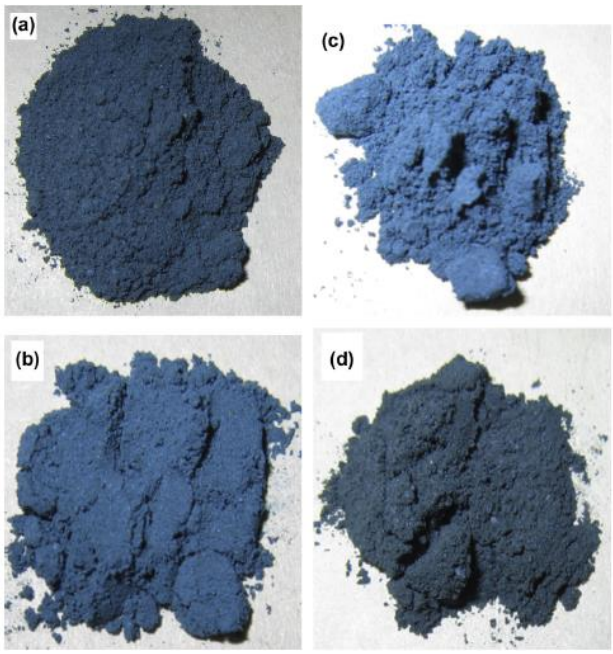



**Figure 3.** Effect of ß-alanine on the colour performance of spinel a. 0, b. 5/5, c. 35/6 and d. 54/7 wt.% (Torkien and Daghihi, 2014)

Jiao et al., studied the effects of several capping agents on the crystalline and morphological features of synthesis zirconia nano-particles. Tetragonal zirconia particles were observed in the addition of polyhydric alcohols in the ellipse and sphere forms and the particle sizes were varied between 8-40 nm. In the addition of alkyl halides as a capping agent, monoclinic zirconia was synthesized in the spindle-like particles and the particle sizes were in 40×15 nm (Jiao et al., 2003).

Edrissi et al., synthesized the blue copper phthalocyanine (CuPc) particles in the range of 5 – 35 nm by using the microwave heating. The results indicated that the use of lauric acid as a capping agent prevent the flocculation (Edrissi et al., 2017).

Hebeish et al., used the redoxal and rongalate for the water-insoluble vat dyes for the textile printing. The results indicated that higher colour strength can be obtained with the use of a capping agent (Hebeish et al., 2016).

Zhou et al., studied the effect of polyacrylamide on $Co_{1-x}Ca_xAl_2O_4$ synthesis with a gel method. According to the results, the crystallite sizes decreased from 45 nm to 23 nm with the increase of calcium content (Zhou et al., 2018).

## CONCLUSION

Nano-pigments are required in developed printing technologies. The smaller particles provide the higher surface areas that could increase coverage and catalytic feature of synthesized particles. There is a tendency to inorganic ceramic pigments in nano-scale because of their high thermally and chemically stabilities. The traditional methods can be summarized with the solid-state reaction of sources to prepare micron-sized particles while liquid-state reaction methods generally are preferred in nano-pigment synthesis.

The researches on inorganic nano-pigments are about to synthesis by using different experimental procedures at several reaction parameters such as the stoichiometric ratio of starting materials, pH, temperature, time, ultrasonic treatment, calcination, types of selected sources. The effect of capping agents on the prepared particle are only explained in terms of morphological and particle size distribution. However, the effects of used organic agents on the reaction mechanism is not clear. The experimental results indicated that colour or chemical strength can be affected by capping agent addition.

In this study, the probable effects of capping agents on the reaction mechanism, lattice structure of synthesized particle and particle agglomeration were interpreted. It is essential to investigate the relationship between agents and metal particle to determine the best fitted capping agent on selected inorganic pigment preparation. With this purpose, the bonding mechanism between organic additive and metal cation was explained. Also the capping agents were categorized according to the donor atom.

The recent studies on nano-pigments preparation underlined that enzymes and/or polyphenols can be used for green chemistry approach. For the environmental health, the ideas of green synthesis methods should be preferred in inorganic pigment synthesis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Coordination Unit for Scientific Research Projects, Nisantasi University (Project No: BAP00009).

## REFERENCES

Arulmozhi KT, Mythili N 2013. Studies on the chemical synthesis and characterization of lead oxide nanoparticles with different organic capping agents. AIP Advances, 3, 122122 1-9.

Calatayud JM, Alarcon J 2017. V-containing $ZrO_2$ inorganic yellow nano-pigments prepared by hydrothermal approach. Dyes and Pigments, 146: 178-188.

Campisi S, Schiavoni M, Chan-Thaw CE, Villa A 2016. Untangling the role of the capping agent in nanocatalysis: recent advances and perspectives. Catalysts, 6, 1-21.

Darani AB, Aminian MK, Zare H 2017. Synthesis and characterization of two green nanopigments based on chromium oxide. Progress in Color Colorants and Coatings, 10: 141-148.

Dondi M, Blosi M, Gardini D, Zamelli C 2012. Ceramic pigments for digital decoration inks: an overview. http://www.qualicer.org/recopilatorio/ponencias/pdfs/2012088.pdf [14.01.2020]

Edrissi M, Nasenejad B, Sayedi B 2007. Novel method for the preparation of copper phthalocyanin blue nanoparticles in an electrochemical cell irradiated by microwave. IJE Transactions B: Applications, 20: 257-262.

Gulati S, Sachdeva M, Bhasin KK 2018. Capping agents in nanoparticle synthesis: Surfactant and solvent system. AIP Conference Proceedings, 1953:030214 1-4.

Hebeish A, Rekaby M, Shahin AA, Ragheb AA 2016. Novel Nanopigment Derived from Vat dyes for Printing Cotton Fabrics. Egyptian Journal of Chemistry, 59:99-114.

Izu N, Shen R, Shin W, Itoh T, Nishibori M, Matsubara I 2009. Preparation of core-shell type cerium oxide/ polymer hybrid nanoparticles for ink-jet printing. Journal of Ceramic Society of Japan, 117: 768-772.

Javed R, Usman M, Tabassum S, Zia M 2016. Effect of capping agents: Structural, optical and biological propertiesof ZnO nanoparticles. Applied Surface Science, 386:319-326.

Jiao X, Chen D, Xiao L 2003. Effects of organic additives on hydrothermal zirconia nanocrystallites. Journal of Crystal Growth, 25, 158–162.

Khademolhoseini S, Talebi R 2016. Green synthesis and characterization of cobalt aluminate nanoparticles and its photocatalyst application. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 27: 2938–2943.

Kürkçü EA, Boya sektöründe solvent kullanımı: iş güvenliği açısından tehlikeleri ve alınması gereken önlemler, http://www.isgum.gov.tr/rsm/file/isgdoc/IG5-boya_sektorunde_solvent_kullanimi.pdf [31.12.13]

Latha K, Raghasudha M, Aparna Y, Ramchander M, Ravinder D, Jaipal K, Shridhar D 2017. Effect of capping agent on the morphology, size and optical properties of $In_2O_3$ nanoparticles. Materials Research, 20(1): 256-263.

Nejad FM, Baghshahi S, Bakhtiari L 2011. Advantages of nano pigments over micro pigments in obtaining larger spectra of colours in CMYK System. Transactions of the Indian Ceramic Society, 70:2, 93-99.

Özel E 2004. Seramik pigmentlerinin üretimi, karakterizasyonu ve uygulanması, Anadolu Üniversitesi, Doktora Tezi, Eskişehir.

Phan CM, Nguyen HM 2017. Role of Capping Agent in Wet Synthesis of Nanoparticles. Journal Of Physical Chemistry A, 121:3213−3219.

Rajabi M, Kaharaziyan P, Montezari-Pour M 2019. Microwave-assisted processing of cobalt aluminate blue nano-ceramic pigment using sol–gel method. Journal of the Australian Ceramic Society, 55:219–227.

Rajan K, Roppolo I, Chiappone A, Bocchini S, Perrone D, Chiolerio A 2016. Silver nanoparticle ink technology: state of the art. Nanotechnology, Science and Applications 9: 1–13.

Rangappa D, Naka T, Kondo A, Ishii M, Kobayashi T, Adschiri T 2007. Transparent $CoAl_2O_4$ hybrid nano pigment by organic ligand-assisted supercritical water. Journal of the American Chemical Society, 129: 11061-11066.

Saket S, Rasouli S, Arabi AM, Sani AMF 2016. A novel approach to the synthesis of a wide range of ink jet printer pigment from yellow to magenta for tiles via gold nanoparticles. Journal of Ceramic Processing Research, 17:246-252.

Torkien L, Daghihi M 2014. Effects of b-alanine on morphology and optical properties of $CoAl_2O_4$ nanopowders as a blue pigment. Advanced Powder Technology, 25:735-744.

Zhou N, Li Y, Zhang Y, Shu Y, Nian S, Cao W, Wu Z 2018. Synthesis and characterization of $Co_{1-x}Ca_xAl_2O_4$ composite blue nanopigments by the polyacrylamide gel method. Dyes and Pigments, 148: 25-30.

# Ocratoxin A and its problems in food

Gülsüm Atasoy*, Rahmi Ertan Anlı

Ankara University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Ankara, Turkey

*Corresponding author e-mail: atasoygulsum72@gmail.com

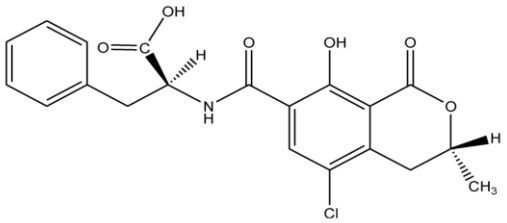
**Abstract**
Mycotoxins are formed by secondary metabolism of some molds (*Penicillium, Fusarium, Aspergillus, Clavicep* and *Alternaria*) and are natural toxins with various chemical structures that threaten human and animal health. Ochratoxin, trichothecenes, aflatoxin (AF), cyclopyazonic acid, patulin, fumonisin and zeranol are mycotoxins in foods. Ochratoxin A (OTA) is a nephrotoxic toxin synthesized by *Penicillium* and *Aspergillus* fungi (molds) (*A.melleus, A.ochraceus, A.albertensis, A.wentii, A.niger var. niger, A.alliaceus, A.sclerotorium, A.ostianus, A.auricomus, A.sulphureus* and *P.viridicatum*) commonly found in nature. *Penicillium* molds produce OTA in temperate-cold regions while molds of the genus *Aspergillus* are produced in tropical-sub-tropical regions. These mold genera can produce various toxins simultaneously, usually ochratoxin A, B, C. Ochratoxin A (OTA); barley, wheat, rye, corn, as well as nuts, pulses, wine, beer, raisins, coffee beans, cocoa and grapefruit juice are found in various food products. *Aspergillus* species are mainly responsible for OTA contamination in grapes, coffee and spices and *P. verrucusoum* is responsible for OTA contamination in cereals. In addition, *P. nordicum* is the mold species responsible for OTA contamination in meat and cheese. These toxins produced by molds cause immunotoxic, teratogenic and carcinogenic effects in humans. Ochratoxin A (group 2B) has been classified as a possible human cancer agent by the International Agency for Research on Cancer (IARC). In recent years; vinegar, wine, grape juice and raisin fruits may contain significant amounts of OTA. It also causes significant problems in grain products. Good agricultural practices and HACCP procedures should be applied during harvesting and production to prevent or reduce the risk of OTA contamination. Ochratoxin A maximum limits for various foods according to Turkish Food Codex (TGK); unprocessed grains and roasted coffee beans and ground coffee for 5.0 µg/kg; dried vine fruits and coffee extract, soluble coffee extract or soluble coffee for 10.0 µg/kg; wine - fruit wines and grape juice, grape juice concentrate, grape row and grape row concentrate for direct consumption with grape nectar for 2,0 µg/kg; supplementary foods and dietary foods to infants and young children for 0,5 µg/kg. In this study, the importance of OTA problem, which can be encountered in different foods and threatens our health is emphasized and measures and practices that can be taken in our country and in the world and the acceptable minimum limits of OTA according to the countries are discussed.
**Key Words**: Food safety, Health, OTA.

## INTRODUCTION

Ochratoxin A (OTA); it is a mycotoxin produced by secondary metabolism of many filamentous (filamentous) species of the genus *Aspergillus* (*A.melleus, A.ochraceus, A.albertensis, A.wentii, A.niger var. niger, A.alliaceus, A.sclerotorium, A.ostianus, A.auricomus, A.sulphureus)* and *Penicillium (P. verrucusoum, P.viridicatum, P. nordicum*) during storage of food (El Khoury and Atoui 2010; Duarte et al., 2012). These mushrooms are widely found in nature because they can develop in various environmental conditions such as humidity, pH, and temperature (Keyvan and Yurdakul, 2015). Ochratoxin A has a toxic effect and is very important in terms of food safety since it is contaminated with various products (Duarte et al., 2012). There are ochratoxin A in different food products, including cereal and cereal products, oilseeds, coffee, bread, chocolate, figs, grape juice, dried meat and fruits, poultry, pork, wine-beer and various herbs (Cabañes et al., 2010; Oğuz 2017). Of these products, cereal products (cereals, rye-wheat bread, multigrain bread, sweet biscuits and musli) generally represent 50-80% of OTA intake (Anlı and Alkıs, 2010; Di Stefano, 2018). Ochratoxin A by the International Agency for Cancer Research (IARC); it is classified as a Class IIB carcinogen (IARC, 1993). As a result of the studies, this molecule; it has been found to have various toxicological effects such as hepatotoxic, neurotoxic, teratogenic and immunotoxic (El Khoury and Atoui, 2010). OTA mostly affects the kidney and thus causes kidney failure/problems and urothelial - testicular cancer in both humans and animals (Cabañes et al., 2010; Gürhayta and Çağındı, 2015). The effects of OTA at the molecular level; inhibition of protein synthesis and blood clotting and gluconeogenesis, suppression of adipogenesis, lipid peroxidation, DNA breaks, disruption of oxidative phosphorylation in mitochondria and apoptotic effect. After the toxin is first metabolized in the liver, it is excreted in bile and included in the

systemic circulation (Türel & Calapoğlu, 2017). The acceptable daily intake of OTA was determined as 17 ng/kg and 14 ng/kg, respectively, by JECFA to which EFSA and FAO and the World Health Organization (WHO) are also affiliated (Gürhayta and Çağındı, 2015). In addition, if 70 µg/kg OTA levels are exceeded by diet it can cause kidney tumors (Reddy and Bhoola, 2010).
According to the European Union Food and Feed Rapid Alarm System (RASFF) report a total of 30 "Rapid Alert Alarms" related to OTA were reported in 2019. Rapid alert alarms specified for OTA; given for foodstuffs such as cereals and bakery products, fruits and vegetables, soft drinks, cocoa and cocoa products, coffee and tea, herbs and spices, nuts - nuts products, diet foods, food supplements, fortified foods and other food products/mixtures (Anonymous, 2020).

**Chemıcal Structure and Physıcal Chemıcal Properties Of Ochratoxin A**




.

**Figure 1**. The chemical structure of ochratoxin A (El Khoury and Atoui, 2010).

- Chemical formula: C20H18O6NCl (Anlı and Alkıs, 2010).
- Chemical name: L-phenylalanine-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl) carbonyl]-(R)–isocoumarin (El Khoury and Atoui, 2010).
- pKa value 7.1 and molar mass 403.8 $g.mol^{-1}$ (El Khoury and Atoui, 2010).
- It is white, odorless, heat resistant, crystalline substance (melting point: 168-173 °C) and low solubility in water (Köszegi and Poor, 2016).
- Due to the structure of OTA, it exhibits strong fluorescence and has a dense green fluorescence under UV light in a medium-acid environment and blue fluorescence in alkaline conditions (El Khoury and Atoui 2010; Köszegi and Poor, 2016).
- OTA is found in non-ionic, monoanionic ($OTA^{-}$) and dianionic ($OTA^{2-}$) forms depending on the microenvironment. Based on data from animal experiments, the non-ionic and monoanionic forms of OTA are absorbed from the stomach and jejunum without known special transport mechanisms (Köszegi and Poor, 2016).
- It is resistant to food processing such as cooking, fermentation and roasting (Sedefoğlu, 2013). This molecule is resistant to three hours of high pressure steam sterilization at 121 °C (35% of OTA continues its effectiveness) and cannot even be destroyed or partially degraded even at 250 °C (Köszegi and Poor, 2016; Gürhayta and Çağındı, 2015).

**OTA Levels In Dıfferent Foods**

Due to its various toxicological effects, the OTA content in different foodstuffs needs to be determined (Di Stefano, 2018). According to a study conducted in Lebanon, while the OTA concentration is 2.8 µg $kg^{-1}$ for croissants and biscuits, alcoholic beverages are 1.4 µg $L^{-1}$ (Raad et al., 2014). It was determined that the amount of OTA varies in the range of 0.2-8.8 ng/g in the breakfast cereal samples (corn, wholemeal and fruit, chocolate, rice and oat) collected in France. The highest concentration was observed in the sample containing dried fruit and dandruff (Moliné et al., 2005). OTA was determined as 0.28 ng/g in nut bread, 0.29 ng/g in wheat-based breakfast cereals, 0.72 ng/g in corn-based breakfast cereals, 0.23 ng/g in baby food, 0.24 ng/g in peanut, 0.22 ng/g in pistachio and 0.02 ng/L in beer (Coronel et al., 2012). The OTA level of wheat bread in five different cities (Témara, Rabat, Casablanca Salé, and Meknès) in Morocco was investigated. In positive samples, OTA levels ranged from 0.14 to 149 ng/g, whereas in positive samples the average OTA level was found to be 13 ng/g (Zinedine et al., 2007). In Adana, the presence of OTA in 46 loaves and 4 pita bread were investigated. OTA levels of 0.13, 0.28, 0.42 and 0.88 µg/kg in 4 loaves of bread and 0.98 µg/kg in 1 pita bread were determined (Koç and Var, 2018). Cengiz et al. (2007) investigated the amount of OTA in 132 different

types of flour and bread samples (10 corn flour, 14 bran flour, 34 white flour, 10 corn bread, 28 bran bread and 36 white bread). Among the examples, bran flour has the highest OTA level (9.30 µg/kg) while white flour has the smallest value (1.39 µg/kg). OTA was determined in 110 samples and among these, 92 samples were found to have toxin levels above 3 µg/kg. Şeviktürk et al. (2007) detected 360.93 ppt, 241.07 ppt and 384.10 ppt OTA contamination in the wheat flour, rice and bulghur samples offered for consumption in Kayseri, respectively.

OTA risk may arise due to the production of molasses in our country (Keyvan and Yurdakul, 2015). Akdeniz et al. (2013) determined the OTA concentration in 85 samples (10 grape juice, 25 molasses and 50 raisins) collected in Istanbul. Dried grapes, grape juice and molasses samples were determined as 1.15, 1.40 and 2.04 µg/kg respectively. However, 12 of the 25 molasses samples have been found to have a higher level (over 2 µg/kg for grape juice) than allowed for safe consumption by the European Union (EU). Anlı et al. (2011) found an average of OTA 0.27 µg/L in 18 red grape must and 0.13 µg/L in 8 white grape must. In another study, OTA amount of Turkish wine samples were compared. In the results obtained, OTA content of red, white and pink (rosé) wine was found 0.728 µg/L, 0.164 µg/L and 0.526 µg/L, respectively (Anlı et al., 2005).

As a result of the studies conducted to investigate the presence of ochratoxin A in dried fruits; OTA was detected in dates, dried figs, grapes, apricots, quince and dried coconut (Gürhayta and Çağındı, 2015). Bakırcı et al. (2016) detected OTA in the range of 2.54-32.91 µg/kg in 26 samples from 80 raisin samples collected in İzmir, Aydın, Manisa.

OTA contamination occurs in milk, but for dairy cows there is a lack of information about the rate of this toxin transfer to milk. In milk sheep, the rate of toxin transfer is less than 1% (Di Stefano, 2019). Boudra et al. (2007) evaluated the presence of OTA in the milk of the cow fed with corn feed and grain. OTA levels of 5-8 ng/L were detected in the milk sample, which does not pose a special risk for dairy consumers. Keyvan et al. (2018) investigated the amount of OTA in milk collection tanks in the Burdur region. OTA in the range of 2-270 ng/L was detected in 40 cow milk samples taken from tanks. As a result of these studies, it has been determined that cow milk consumed is a potential source of OTA.

## OCRATOXIN A LIMITS IN THE WORLD AND IN OUR COUNTRY

The levels that our country complies with are given according to the European Union document (EU, 2006) and this legislation is also included in the Turkish Food Codex (TGK) Communicators Communiqué (Anonymous, 2011). The following Table 1. shows the world some countries and Turkey OTA maximum limits (µg/kg) was given.

Table 1. Maximum limits in different countries for Ochratoxin A in food products (µg/kg).

| Food products | Turkey-EU Countries | Indonesia | Korea | Brazil | China |
|---|---|---|---|---|---|
| Unprocessed cereals | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 10,0 | 5,0 |
| Dried vine fruit (currants, raisins and seedless raisins) | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | |
| Roasted coffee beans except instant coffee and ground coffee | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 10,0 | 5,0 |
| Instant coffee | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Wine (including sparkling wine, liquor wine and alcohol content not less than 15% alcohol excluded) and fruit wine | 2,0 | 0,20 for Beer | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Flavored wine, flavored wine-based drinks and aromatized wine products cocktails | 2,0 | | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Grape juice designed for direct human consumption, diluted concentrated grape juice, grape nectar, grape must and diluted concentrated grape juice | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Processed grain-based foods and baby foods for infants and young children | 0,50 | 0.50 | 0,50 | 2,0 | |
| Dietary foods for special medical purposes - specially designed for infants | 0,50 | 0.50 | 0.50 | | |
| Spices, -including dried spices-<br>*Piper* spp. (including fruits, white and black pepper), *Myristica fragrans* (nutmeg), *Zingiber officinale* (ginger), *Curcuma longa* (curcuma) | 15 | 20,0 | 7,0 for Capsicum Powder | 30,0 | |
| *Capsicum* spp. (dried fruits - whole or ground - including chili pepper, chili powder, hot pepper and chili) | 20 | 20,0 | | 30,0 | |
| Spice mixtures containing one of the above mentioned spices | 15 | 20,0 | | 30,0 | |
| Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza inflate* and other species) | 20 | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Licorice extract - especially for use in beverages and confectionery - | 80 | | | 5,0 for Cocoa and Chocolate Products | |
| Wheat gluten not sold directly to consumers | 8,0 | | | | |
| Cereal-based foods and baby foods processed for infants and young children, Dietary foods for special medical purposes (specially designed for babies) and excluding foodstuffs such as wheat gluten not sold directly to the consumer, processed cereal products and all products from unprocessed grains, including grains intended for direct human consumption | 3,0 | 3,0 | | | |
| References | (Anonymous, 2011; EU, 2006). | (Romer Labs, 2016a) | (Romer Labs, 2016b) | (Romer Labs, 2016c) | (Romer Labs, 2016d) |

The European Commission has not set a maximum allowed OTA limit for meat and other animal origin foods, but some countries such as Slovakia (meat and milk: 5 µg/kg), Denmark (pork kidney: 10 µg/kg), Romania (Pork kidney, liver and meat: 5 µg/kg) and Estonia (Pork liver: 10 µg/kg) have set maximum limits (Keyvan and Yurdakul, 2015).

**Measures To Be Taken In The Creatıon Of Ocratoxin A**

With the increasing consumer awareness, food safety has become an important position (Kleter and Marvin, 2009). Worries about mycotoxins synthesized by molds in foods increase due to their effects on production, human-animal health and trade economy (Wagacha and Muthomi, 2008). Ocratoxin A one of mycotoxins, is important in terms of toxicity (Duarte et al., 2010). Therefore apart from the direct health risk, the effects of economic losses due to mycotoxicosis are also quite large. Many developing countries have realized that lowering mycotoxin levels in foods will not only reduce the financial burden on healthcare, but also provide international trade advantages such as exports to attractive European markets (Wagacha and Muthomi, 2008). There are three ways to prevent mycotoxin contamination in foods;

- Decontamination,
- Prevention of exposure to mycotoxins,
- Continuous surveillance and monitoring of molds in contaminated food/feed (Wagacha and Muthomi, 2008).

Execution of operational procedures in accordance with Good Hygiene Practices (GHP), Good Agricultural Practices (GAP) and Hazard Analysis Critical Control points (HACCP) rules during the production, harvesting, storage, transportation, marketing, processing of the field prevents mycotoxin formation (Oğuz, 2017; Bayram and Anlı, 2008; Wagacha and Muthomi, 2008). Mycotoxin analyzes should be carried out for a period of time and food-feed ingredients should be preserved in an environment where mold growth is limited (Oğuz., 2017). In addition, one of the methods applied to prevent mold growth and toxin formation in foods is the treatment of foods with plant extracts (thyme, cinnamon, garlic, cloves, etc.) (Günaydın and Karaca, 2015). Magro et al. (2006) investigated the effects of chamomile, garlic, peppermint, cinnamon, French lavender and mallow extracts on the development of *Aspergillus niger, Aspergillus candidus*, *Fusarium culmorum* and *Penicillium* sp. Among these plant extracts, the highest antifungal effect was detected in malva and chamomile extract. When malva extract is used at the level of 0.30 g/mL; *Penicillium* sp. and *F. cuimorum* showed inhibition effect over 50%. In addition 100% inhibition effect was determined as 0.60 g/mL and 0.92 g/mL for malva and chamomile extract, respectively. In some studies, algae were used for mold growth and control of mycotoxin production.

**RESULTS**

Mold (fungus), one of the microorganisms that can develop in all foods, causes food spoilage. For this reason, mycotoxins should be handled as a food safety issue and more scientific research should be done on this subject in our country. Considering that regional climatic conditions are important in mold development, national studies on the subject should be particularly encouraged. In particular, the public and the media should be informed about the threat of OTA in foods. In the Turkish Food Codex Contaminants Communiqué, the scope of food products for Ochratoxin A should be expanded and reorganized, especially for foods of animal origin.

**REFERANCES**

Akdeniz AS, Ozden S, Alpertunga B 2013. Ochratoxin A in dried grapes and grape-derived products in Turkey. *Food Addit. Contam. B.* 6, 265- 269.

Anli E, Cabuk B, Vural N. & Başpınar E 2005. Ochratoxin A in Turkish wines. *Journal of food biochemistry*, *29*(6), 611-623.

Anli E. & Alkis İM 2010. Ochratoxin A and brewing technology: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(1), 23-32.

Anli RE, Vural N & Bayram M 2011. Removal of ochratoxin A (OTA) from naturally contaminated wines during the vinification process. *Journal of the Institute of Brewing*, *117*(3), 456-461.

Anonymous, 2011. Turkish Food Codex Contaminants Regulation. http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/2011 1229M3-8.htm. (Date of access: 03.03.2020).

Anonymous, 2020. RASSF Portal Database, https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&NewSearch=1&Keywords=ochratoxin (Date of access 18.02.2020).

Bakırcı GT, Çakmak F & Özdemir D 2016. Ege Bölgesi'nde satışa sunulan kuru üzümlerde okratoksin A ve küf ilişkisi. *Akademik Gıda*, *14*(4), 407-411.

Bayram M & Anlı E 2008. Mikotoksinler ve şarap. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, *10*, 21-23.

Boudra H, Barrnouin J, Dragacci S, Morgavi, DP 2007. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *J. Dairy Sci.* 90, 3197-3201.

Cabañes FJ, Bragulat MR, & Castellá G 2010. Ochratoxin A producing species in the genus Penicillium. *Toxins*, *2*(5), 1111-1120.

Cengiz M, Oruç HH, Uzunoğlu, İ & Sonal S 2007. Ochratoxin A levels in different types of bread and flour (farklı tip ekmek ve unlarda okaratoksin A düzeyleri). *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *26*(1-2), 7-10.

Coronel MB, Marin S, Cano-Sancho G, Ramos AJ, Sanchis V 2012. Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts, coffee, wine, and beer. Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 29, 979-993.

Di Stefano V 2018. Occurrence & Risk of OTA in Food and Feed. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 420.

Duarte SC, Pena A, Lino CM 2010. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. Food Microbiol. 27, 187-198.

Duarte SC, Lino CM, & Pena A 2012. Food safety implications of ochratoxin A in animal derived food products. *The Veterinary Journal*, *192*(3), 286-292.

El Khoury A & Atoui A 2010. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins*, *2*(4), 461-493.

EU, 2006. Amended Commission regulation (EU) No. 2019/290 of 26 February 2020. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance)**.** Official *Journal of European Commission L*. Vol 55 (2019), 27p. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2006/1881/2018-03-19.

Gürhayta O & Çağındı Ö 2015. Kurutulmuş Meyvelerde Aflatoksin ve Okratoksin A Varlığının ve Sağlık Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, *12*(2).

Günaydın Ş & Karaca H 2015. Küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun kontrolünde doğal bitki ekstraktlarının kullanımı. *Akademik Gıda*, *13*(2), 173-182.

IARC, 1993. Some Naturally Occurring Substances, Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Monograph No. 56. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 489pp.

Keyvan E, Yurdakul Ö 2015.Çeşitli gıdalarda Okratoksin A varlığı. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 3(1):27-33.

Keyvan E, Yurdakul Ö, Kocasarı F, Tutun H, Demirtaş A, Kahraman HA & Şen E 2018. Süt Toplama Tanklarında Okratoksin A Varlığının Belirlenmesi. *Kocatepe Vet J* (2018) 11(3): 255-259. DOI:10.30607/kvj.424808.

Kleter GA and Marvin HJP 2009. Indicators of emerging hazards and risks to food safety. *Food Chem Toxicol*, 47: 1022–1039.

Koç NF, Var I 2018. Adana'da fırın ve marketlerde satışa sunulan ekmeklerde Okratoksin A (ota) varlığının HPLC yöntemi ile araştırılması. Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi Cilt: 36-6.

Kőszegi T & Poór M 2016. Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, *8*(4), 111.

Magro A, Carolino M, Bastos M & Mexia A 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista iberoamericana de micología*, *23*(3), 176-178.

Moliné A, Faucet V, Castegnano M, Pfohl-Leszkowicz A 2005. Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in ochratoxin A, citrinin and fumonisin $B_1$. Development of a new method for simultaneous extraction of Ochratoxin A and citrinin. Food Chem. 92, 391-400.

Oğuz H 2017. Mikotoksinler ve Önemi. *Turkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, *3*(2), 113-119.

Raad F, Nasreddine L, Hilan C, Bartosik M, Parent-Massin D 2014. Dietary exposure to aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol from a total diet study in an adult urban Lebanese population. Food Chem. *Toxicol*. 73, 35-43.

Reddy L, Bhoola K 2010. Ochratoxins—food contaminants: Impact on human health**.** *Toxins*, 2 (4) (2010), pp. 771-779. https://doi.org/10.3390/toxins2040771.

Romer Labs, 2016a. **Mycotoxin Regulations for Food and Feed in the Indonesia**. https://www.romerlabs.com/fileadmin/user_upload/romerlabs/Documents/PDF_Files/Regulierungsposter_Mycotoxins_Indonesia_0816.pdf.

Romer Labs, 2016b. **Mycotoxin Regulations for Food and Feed in the Korea**. https://www.romerlabs.com/fileadmin/user_upload/romerlabs/Documents/PDF_Files/Regulierungsposter_Mycotoxins_Korea_0916.pdf.

Romer Labs, 2016c. **Mycotoxin Regulations for Food and Feed in the Brazil**. https://www.romerlabs.com/fileadmin/user_upload/romerlabs/Documents/PDF_Files/ANVISA-RDC-7_180211.pdf.

Romer Labs, 2016d. **Mycotoxin Regulations for Food and Feed in the China**. https://www.romerlabs.com/fileadmin/user_upload/romerlabs/Documents/PDF_Files/PO_MTX_Food_Feed_Combi_CN_EN_A2_0519_MBA.pdf.

Sedefoğlu C 2013. Antep Fıstıklarında Okratoksin A Ve Aflatoksin Varlığının İncelenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Şeviktürk İM & Gönülalan Z 2007. Kayseri'de Tüketime Sunulan Bazı Tahıl Ürünlerinde Okratoksin A Miktarları. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, *16*(2), 86-90.

Türel Y and Calapoğlu Ş 2017. Mikotoksinler ve moleküler düzeydeki etkileri. *Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Dergisi*:24(1):24-28.

Zinedine A, Juan C, Idrissi L, Mañes J 2007. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. Microchem. J. 87, 154-158.

Wagacha JM and Muthomi JW 2008. Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int J Food Microbiol*, 124: 1–12.

Wambacq E, Vanhoutte I, Audenaert K, De Gelder L & Haesaert G 2016. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(7), 2284-2302.

# Improvement of the properties of recycled PA-6 by reactive extrusion with chain extenders

Basak Tuna[1*]

[*1]Kirsehir Ahi Evran University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Metallurgical and Materials Engineering, Kirsehir, Turkey.

*Corresponding author e-mail: basaktuna@ahievran.edu.tr

## Abstract

The recycling of the polymers has become more important nowadays due to the increasing environmental concerns and limited fossil resources. However, in practice the up-grading plastic recycling technology has some difficulties like thermo-mechanical degradation of the polymers during multiple processing cycles. Such degradation reactions result in splitting polymer chains thus molecular weight of the polymer decreases. One of the solutions to this problem is reactive extrusion method based on the reaction of chemical compounds called as chain extenders with reactive end groups of split polymer chains during extrusion process. This study investigates rebuilding the molecular weight of the recycled polyamide-6 (rPA6) using two different commercial chain extenders (a multi-anhydride functional chain extender and a multi-epoxy functional chain extender) in a twin-screw extruder. The thermo-mechanical degradation of rPA6 was observed by rheology, tensile test and thermo-gravimetric analysis. It was found from rheological data that epoxy functionalized chain extender showed a slight enhancement (25%) in the complex viscosity of rPA6, whereas the relative change is interestingly striking for anhydride functionalized chain extender indicating a 306% in that of rPA6. Mechanical and thermal (DSC and TGA) tests confirmed the outstanding efficacy of the multifunctional anhydride chain extender. The research brings out important knowledge on developing chain extenders for other degraded polymers regard to understanding the degradation reaction and finding the most reactive end group of the split chains.

**Keywords:** Recycling, reactive extrusion, chain extender, polyamide-6, rheology.

## INTRODUCTION

Polyamide-6 (PA6), also known as nylon-6 is one of the most important and widely used engineering thermoplastic (Kohan, 1995). The superior mechanical properties, chemical resistance and barrier properties make it suitable for a wide range of applications (Liu et al., 2018). The majority of PA6 is used in the textile industry replacing natural fibers to produce reasonably priced clothes and carpets. The remainder is packaging industry for film applications; automotive industry to manufacture intake manifolds, seat belts, fuel lines and hoses; consumer goods industry to produce housewares, toys, electronics and sport items (SPE, 1998). The life span of these products is generally short and leads to environmental problems such as plastic wastes and natural resources depletion (Grosse, 2010). Recycling here becomes a necessity, however PA6 undergoes thermo-mechanical degradation during extrusion and injection molding reprocessing cycles (Buccella et al., 2014). Such degradation leads to scission of the polymer chains and reduction in molecular weight therefore the polymer exhibits poor mechanical properties and melt strength (Goitisolo et al., 2008). To overcome this problem, solid state polymerization (SSP) has been used over many years to rebuild molecular weight of the polymers. This method is applied prior to extrusion in which the polymer is heated above the melting temperature under vacuum or inert gas atmosphere to remove by-products of reactions. However, the major drawbacks of SSP are being very expensive and requiring longer processing times (Scheirs and Long, 2003). Alternatively, reactive extrusion using chain extenders can be suggested to enhance molecular weight of the polymers as an cost effective and fast method. Basically, this technique is based on using di-or multifunctional chemicals known as chain extenders to relink splitted chains of the degraded polymer (Loontjens 2005, Villalobos et al. 2006). Polycondensates are suitable for the reaction with these chain extenders due to having reactive chain end groups (OH, $NH_2$, COOH) and this rebridging reaction is so called chain extension. Such chain extension reactions can be carried out using single or twin screw extruders therefore reactive extrusion term is generally used to call this method (Loontjens, 2005). The idea of reactive extrusion of recycled

polymers using chain extenders is not new and applied to polyesters such as poly(ethylene terephtalate) (Awaja and Pavel, 2005) and poly(lactic acid) (Tuna and Ozkoc, 2017) succesfully. Thus, this research seeks for adaptation of this method to recycled PA6 (rPA6) in order to recouple splitted chain ends. As shown in Figure 1, thermal degradation of PA6 can be divided into two parts: First one is hydrolytic peptide scission in the presence of water or moisture which results in carboxyl and amine end groups. This should be not considerable during extrusion as the moisture is eliminated by careful drying procedure of the materials and processing in an inert gas atmosphere. In the absence of the water which is the case in our study, scission of the alkyl-amide linkage results in amide and vinyl end groups (Levchik et al., 1999). Hence, the chain extender for such degradation reaction should be highly reactive with amide end groups of PA6. To examine our hyptothesis; we shall use a styrene acrylic copolymer with multi-anhydride functionalities (ANHY). The expectation is that anhydride functional groups of the chain extender react with amide ends of recycled PA6 and molecular weight increases. Besides, a styrenic glycidyl acrylate copolymer with multi-epoxy functionalities (EPOX) will be used to test our supposal further. The epoxy groups of this chain extender are highly reactive with carboxyl ends of the polymers, so we can observe enhancements in the properties of recycled PA6 if hydrolytic peptide scission occurs. To analyze chain extension reaction, rheological and mechanical properties will be measured which are directly linked to molecular weight. Moreover, DSC analysis will be performed to understand effect of chain extenders on the melting and crystallization behaviours of recycled PA6. TGA tests will be applied to evaluate effect of chain extenders on decomposition of rPA6.

effect of the chain extender thermacompensating degradation with incorporation of chain extenders.

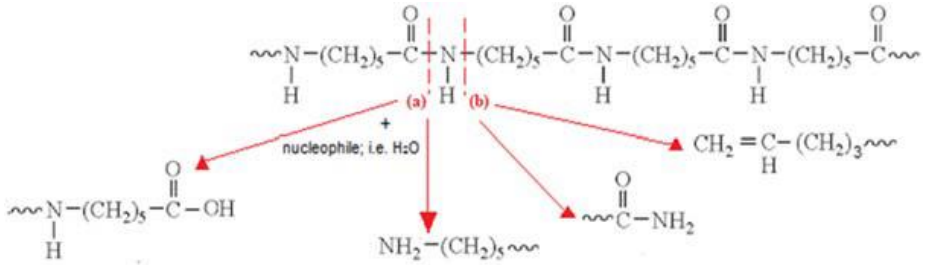


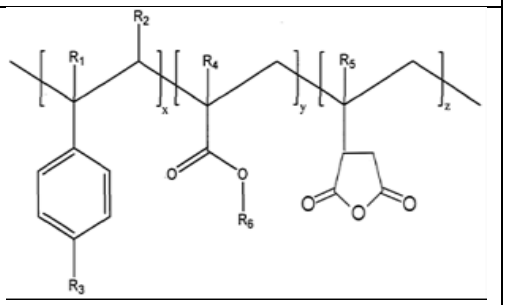

**Figure 1.** Thermal degradation of PA6 (a) in the presence of water (b) in the absence of water

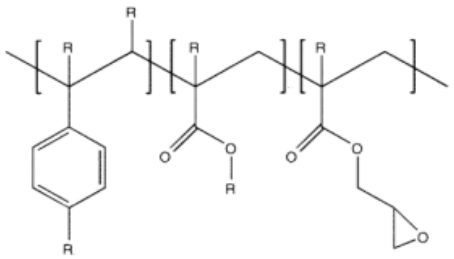
## MATERIALS AND METHODS

*Materials*

Virgin PA6 used in this study was provided by DSM, Netherlands as Akulon F-136. It has a nominal melt viscosity of 2250 Pa.s when measured at 260 °C, and its melting temperature is 235 °C. In order to mimic recycling, we used virgin PA6, then extruded it and the product was so called recycled PA6 (rPA6). The chain extenders used in the study were Joncryl ADR 3400, a styrene acrylic copolymer with multi-anhydride functionalities (ANHY) and Joncryl ADR 4300, a styrenic glycidyl acrylate copolymer with multi-epoxy functionalities (EPOX). Both chain extenders were kindly provided by BASF and specifications were presented in Table 1.

**Table 1**. The properties of the chain extenders used in the study

| Chain extender | Specifications | Chemical structure |
|---|---|---|
| Joncryl ADR 3400 | Molecular weight: 10,000 g/mol<br>Density: 600 kg/m$^3$<br>$T_g$: 133 °C |  |

| | | |
|---|---|---|
| Joncryl ADR 4300 | Molecular weight: 6800 g/mol<br>Density: 1080 kg/m$^3$<br>$T_g$: 54 $^o$C |  |

*Processing*

The virgin PA6 pellets were dried in a vacuum oven at 80 $^o$C for 12 hours to eliminate moisture and avoid further degradation during extrusion. The dried virgin PA6 pellets were subjected to a first processing stage, including extrusion in a 19 mm diameter APV MP19TC (L/D=28) co-rotating linear twin-screw extruder from Baker Perkins, at 100 rpm and using the temperature profile of 230–260–260–260–260 $^o$C (from hopper to die). The extruded PA6 was pulled out from the die as a 3 mm string, then cooled in a water bath and pelletized to obtain the recycled PA6. Then, the recycled PA6 pellets and chain extender were dried in a vacuum oven at 80 $^o$C for 12 hours to be prepared for reactive extrusion. The chain extender loading was fixed at 1wt% based on previous work (Tuna and Benkreira, 2019a). In order to feed accurate amount of rPA6 and chain extender, two separated feeders were used to feed each material simultaneously and directly to barrel. The chain extender and recycled PA6 were melt compounded in the same conditions used in the first processing step. The pelletized extrudates were dried in vacuum at 80 $^o$C for 12 hours before compression molding.

*Characterization*

In order to measure rheological properties, disks of 25 mm diameter and 1 mm thickness were produced by a hydraulic press (Moore Ltd, UK) at 240 $^o$C and a pressure of 50 MPa during 5 min. The compresion molded specimens were dried in a vacuum 80 $^o$C for 12 hours prior to rheological tests. Rheological tests were carried out by a Malvern Bohlin CVO120 rheometer equipped with a 25 mm diameter parallel plate geometry. Amplitude sweep tests were conducted to determine linear viscoelastic region of the samples and 0.1% strain was found to be appropriate. Following that, frequency sweep tests were performed along 0.1-100 Hz frequency range. For each group (virgin PA6, rPA6, rPA6/EPOX and rPA6/ANHY), the tests were repeated with three fresh specimens and average value was reported. The errors in the tests were between 0.2-5.7%.

Dumbbell shaped specimens with a gage section of 2 mm wide, 0.80 mm thick and 12 mm long based on ISO 37_4 test standard were prepared by compression molding (Moore Ltd Press, UK) at 240 $^o$C and a pressure of 50 MPa during 5 min. Mechanical properties of the dumbbell shaped specimens were measured at room temperature by using a Messphysik Beta 20 kN tensile testing machine according to ISO 37_4 standard. The cross-head speed was set to 5 mm/min. A video extensometer was employed to accurately measure the strain. At least five specimens for each category (virgin PA6, rPA6, rPA6/EPOX and rPA6/ANHY) were tested and the average values with standard deviations were reported.

Differential scanning calorimetry (DSC) tests were performed using a TA Instruments calorimeter (Discovery DSC) under a nitrogen atmosphere. The specimens, no more than 10 mg were encapsulated in aluminum pans and heating-cooling-heating cycles (25 $^o$C→260 $^o$C→25 $^o$C→260 $^o$C→) at a scanning rate of 10 $^o$C/min were used to obtain thermograms. The glass transition temperature ($T_g$), the melting temperature ($T_m$), the cold crystallization temperature ($T_{cc}$) and the melting enthalpy ($\Delta H_m$) were determined from the thermograms. The degree of crystallinity ($\chi_c$) was calculated according to Equation 1:

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\omega \Delta H_m^o} \quad (1)$$

where $\Delta H_m^o$ was taken as 240 J/g (Logakis et al., 2009) for 100% crystalline PA6 and ω was used to represent weight fraction of PA6 used.

Thermal decompositon of the samples was investigated by a TA Instruments thermogravimetric analyzer (Discovery TGA) under a nitrogen atmosphere. Samples of 10 mg were heated from 25 to 600 °C with a heating ramp of 10 °C/min. The onset temperature for thermal degradation ($T_{onset}$) was recorded.

## RESULTS and DISCUSSION

*Rheology*

As it is known, there is a close link between rheological behaviour of polymeric systems and their molecular weight (Pearson and Garfield 1978). Hence, rheological properties of the samples are investigated in order to measure quantitatively the change in molecular weight by thermal degradation and chain extension. The linear viscoelastic functions, G' and η* of the samples are plotted as functions of the frequency in Figure 2. Although both chain extenders are effective to rebuild molecular weight, it is obvious that rPA6/ANHY presents a remarkable increase in viscoelastic properties of rPA6. The outstanding effect of anhydride functional chain extender supports our hypothesis in the introduction part that degradation of rPA6 occurs to scission of the thermally weakest bond, alkyl amide linkage in the absence of water. As shown in Figure 3, amide end groups of rPA6 react with anhydride to generate a very stable imide. As a result of this reaction, degraded chains are relinked and the molecular weight of rPA6 increases. Interestingly, anhydride functional chain extender not only rebuilds the molecular weight of rPA6, but also improves it beyond the structure of virgin PA6. This striking increment in modulus and viscosity can be aroused from the formation of chain branching in the structure (Tuna and Benkreira, 2019b).

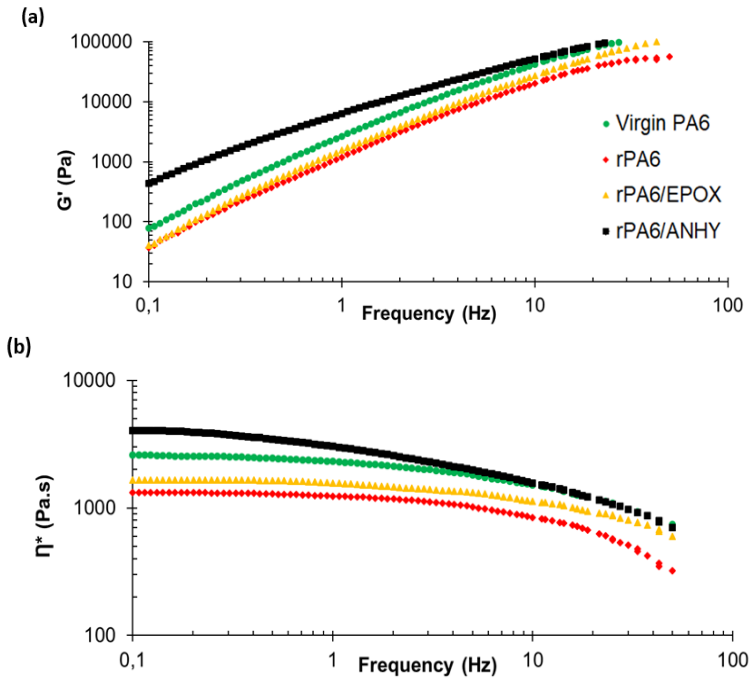



**Figure 2.** (a) Storage modulus G' (b) Complex viscosity η* versus frequency

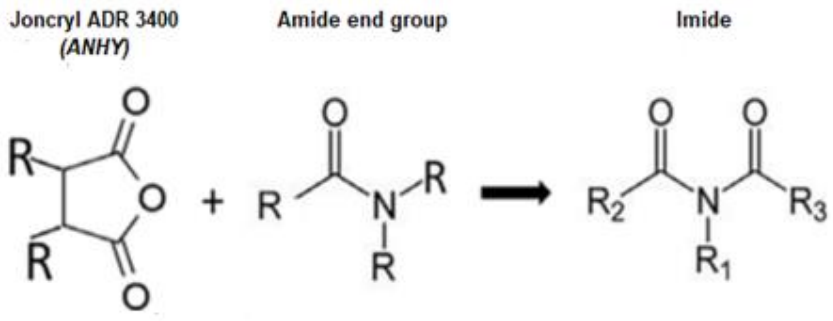



**Figure 3.** Chain extension reaction between PA6 amide end group and anhydride group of chain extender.

To make a better comparison in the viscoelastic properties of the samples, the initial storage modulus and complex viscosity of the samples are given in Table 2. It is clear that thermal degradation impairs the rheological properties of PA6 significantly, rPA6 shows lower storage modulus (57% decrease) and complex viscosity (49% decrease) than virgin PA6. Compared with rPA6, rPA6/ANHY indicates nearly 300% increase in storage modulus and complex viscosity, whereas the relative change is small for rPA6/EPOX (10% increase for storage modulus and 25% increase for complex viscosity).

**Table 2**. Rheological data of the samples at 0.1 Hz frequency

| Sample | G' (Pa) | η* (Pa.s) |
|---|---|---|
| **Virgin PA6** | 86 | 2585 |
| **rPA6** | 37 | 1322 |
| **rPA6/ANHY** | 41 | 1654 |
| **rPA6/EPOX** | 436 | 4038 |

*Mechanical properties*

The molecular weight of polymers has a significant influence on their mechanical properties so the structural changes in the samples such as degradation or chain extension can be followed by measurement of mechanical properties (Martin et al., 1972). Figure 4a-c shows tensile modulus, yield strength and yield strain values of the samples measured. The samples containing anhydride functional chain extender show an increment in tensile modulus and yield strength, while these properties are remained unchanged for epoxy functional chain extender. This result is consistent with rheological data and concludes that chain extender with anhydride is the most appropriate one to compensate thermal degradation of rPA6. Figure 4c presents yield strain data, the change is small but measurable for the samples. The lowest yield strain of rPA6/ANHY can be explained that multiple anydride functional groups of the chain extender lead to long chain branching in the polymer structure. Therefore, higher entanglement density restricts orientation of polymer chains along elongation and this decreases strain of the sample. Contrary to that, the highest strain is measured for rPA6 due to having shorter chains after thermal degradation (Al-Itry et al. 2012, Najafi et al. 2012, Ghanbari et al. 2013).

*Thermal properties*

DSC data in Table 3 presents the changes in the glass transition temperature ($T_g$), the melting temperature ($T_m$), the cold crytallization temperature ($T_{cc}$) and the degree of crystallinity ($\chi_c$) of the samples. As can be seen, rPA6/ANHY and rPA6/EPOX show two melting temperatures which are indication of chain extension. These double melting temperatures are associated with melting of γ (at around 208 $^oC$) and α (at around 222 $^oC$) phases (Garcia-Lopez et al., 2010). These are a consequence of polymorphism characteristic of PA6. The addition of chain extenders into PA6 triggers the development of γ crystalline phases (Fornes et al. 2003, Xie et al. 2005). A reduction in the crystallinity of PA6 can be observed from the chain extended samples (rPA6/ANHY and rPA6/EPOX). This can be explained that chain extension/branching inhibits the packing of the polymer chains to develop crystal lattice. Such effects of chain extenders on the crystallization were previously reported by Ghanbari et al. (2013), Buccella et al. (2014), Lu et al. (2015). rPA6 indicated a lower $T_g$ compared to virgin PA6 and this can be attributed to presence of a high number of chain ends after thermal degradation. These chain ends thus result in a larger free volume and segmental mobility of the polymer chains (Fox and Flory, 1950). On the other hand, chain extended samples showed higher $T_g$ than rPA6 as a result of relinking of degraded chains. TGA data presented in Table 3 clearly shows thermal decomposition of PA6 with recycling. Compared to virgin PA6, $T_{onset}$ of rPA6 significantly drops (about 6 $^oC$) whereas anhydride functional chain extender compensates thermal degradation due to having higher $T_{onset}$ for rPA6/ANHY sample. These findings back up our earlier rheological and mechanical test data.

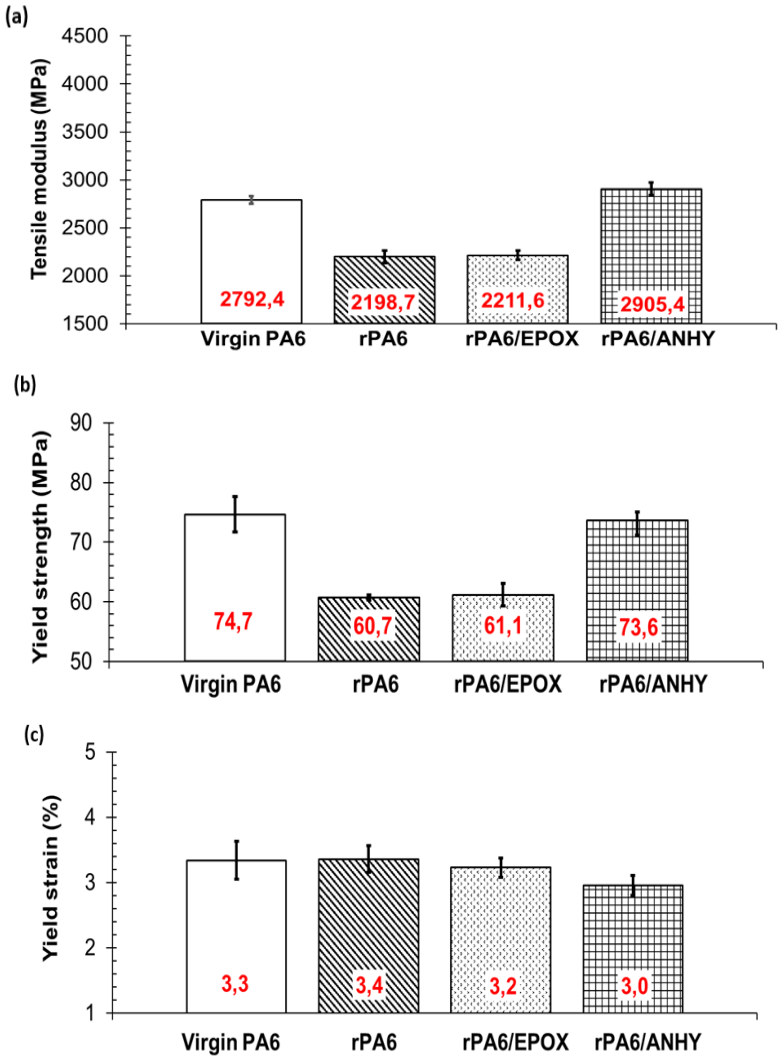



**Figure 4.** Tensile properties of virgin PA6, rPA6 and rPA6/chain extenders

**Table 3**. Thermal properties of virgin PA6, rPA6 and rPA6/chain extenders

| Sample | $T_g$ (ºC) | $T_m$ (ºC) | $T_{cc}$ (ºC) | $\chi_c$(%) | $T_{onset}$ (ºC) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Virgin PA6** | 53.7 | 221.1 | 188.4 | 20.2 | 395.9 |
| **rPA6** | 51.8 | 221.5 | 187.9 | 19.7 | 389.2 |
| **rPA6/EPOX** | 52.8 | 208.4/222.6 | 187.5 | 18.2 | 388.7 |
| **rPA6/ANHY** | 54.9 | 209.2/222.2 | 188.1 | 18.2 | 396.0 |

## CONCLUSION

PA6 has been exposed to thermomechanical degradation during the reprocessing cycles which makes its recycling challenging. Thermal degradation of PA6 in the absence of water (moisture) which is the case in this study occurs as the scission of alkyl-amide linkage and results in amide and vinyl end groups. The method in the research to offset degradation is based on adding very small amounts of chain extenders (1 wt%) into rPA6 during the extrusion. It is called chain extension and offers rebuilding the molecular weight of rPA6 in a more economical and faster way compared to SSP. The mechanical and rheological measurements show that anhydride functional chain extender has a profound effect to compensate thermal degradation of rPA6 whereas epoxy functional chain extender indicates very slight improvement in the properties. These results support our argument that the amide is the most reactive end group of rPA6, and anhydride multifunctional chain extender is the appropriate one for chain extension reaction with rPA6. As an interesting and important outcome of the

study, rPA6/ANHY shows higher rheological (storage modulus, complex viscosity) and mechanical (tensile modulus) properties than even virgin PA6, and this proves development of long chain branching in the polymer structure after chain extension. Regarding to thermal properties, DSC data gives further evidence of chain extension from occurrence of double melting temperatures for rPA6/ANHY and rPA6/EPOX samples. Finally, TGA results confirm thermal degradation of rPA6 and show that anhydride functional chain extender is the most efficient one used in this study.

**REFERENCES**

Al-Itry R., Lamnawar KS, Maazouz A 2012. *Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy.* Polymer Degradation and Stability, 97(10): 1898-1914.

Awaja F, Pavel D 2005. *Recycling of PET*. European Polymer Journal, 41(7): 1453-1477.

Buccella M, Dorigato A, Pasqualini E, Caldara M, Fambri L 2014. *Chain extension behavior and thermo-mechanical properties of polyamide 6 chemically modified with 1,1-carbonyl-bis-caprolactam.* Polymer Engineering and Science, 54(1): 158–165.

Fornes TD, Paul DR 2003. *Crystallization behavior of nylon 6 nanocomposites.* Polymer, 44(14): 3945-3961.

Fox TG, Flory PJ 1950. *Second order transition temperatures and related properties of polystyrene: I. Influence of molecular weight.* Journal of Applied Physics, 21: 581-591.

Garcia-Lopez D, Fernandez JF, Merino JC, Santaren J, Pastor JM 2010. *Effect of organic modification of sepiolite for PA 6 polymer/organoclay nanocomposites.* Composite Science and Technology, 70(10): 1429-1436.

Ghanbari A, Heuzey MC, Carreau PJ, Ton-That MT 2013. *A novel approach to control thermal degradation of PET/organoclay nanocomposites and improve clay exfoliation*. Polymer, 54(4): 1361-1369.

Goitisolo I, Eguizabal JI, Nazabal J 2008. *Effect of reprocessing on the structure and processing of polyamide 6 nanocomposites*, Polymer Degradation and Stability, 93(10): 1747-1752.

Grosse F 2010. *Is recycling "part of the solution"? The role of recycling in an expanding society and a world of finite resources.* Sapiens, 3(1): 1-17.

Kohan MI 1995. Nylon plastics handbook. Cincinnati: Hanser Publishers, 17 pp.

Levchik SV, Weil ED, Lewin M 1999. *Thermal decomposition of aliphatic nylons*. Polymer International, 48(7): 532-557.

Liu K, Li Y, Tao L, Xiao R 2018. *Preparation and characterization of polyamide 6 fibre based on a phosphorus-containing flame retardant.* RSC Advances, 8: 9261-9271.

Logakis E, Pandis C, Peoglos V, Pissis P, Stergiou C, Pionteck J, Potschke P, Micusik M, Omastova M 2009. *Structure-property relationships in polyamide 6/multi-walled carbon nanotubes nanocomposites.* Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 47(8): 764-774.

Loontjens JA 2005. Performance materials by a modular approach. PhD Thesis, Eindhoven University of Technology.

Lu C, Ye R, Yang Y, Ren X, Cai X 2015. *Chemical modification of polyamide 6 by chain extension with terephthaloyl-biscaprolactam*. Journal of Macromolecular Science Part B: Physics, 50(2): 350-362.

Martin JR, Johnson JF, Cooper AR 1972. *Mechanical properties of polymers: The influence of molecular weight and molecular weight distribution.* Journal of Macomolecular Science: Part C, 8(1): 57-199.

Najafi N, Heuzey MC, Carreau PJ 2012. *Polylactide (PLA)-clay nanocomposites prepared by melt compounding in the presence of a chain extender.* Composite Science and Technology, 72(5): 608-615.

Pearson GH, Garfield LJ 1978. *The effect of molecular weight and weight distribution upon polymer melt rheology.* Polymer Engineering Science, 18(7): 583-589.

Scheirs J, Long TE 2003. *Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters*. Sussex: John Wiley&Sons, 24 pp.

SPE 1998. SPE ANTEC. Brookfield: CRC Press, 32 pp.

Tuna B, Ozkoc G 2017. *Effects of diisocyanate and polymeric epoxidized chain extenders on the properties of recycled poly(lactic acid)*. Journal of Polymers and the Environment, 25(4): 983-993.

Tuna B, Benkreira H 2019a. *Reactive extrusion of polyamide 6 using a novel chain extender*. Polymer Engineering Science, 59(S2): 25-31.

Tuna B, Benkreira H 2019b. *Chain extension of polyamide 6-organoclay nanocomposites.* Polymer Engineering Science, 59(6): 1233-1241.

Villalobos M, Awojulu A, Greeley T, Turco G, Deeter G 2006. *Oligomeric chain extenders for economic reprocessing and recycling of condensation plastics.* Energy, 31(15): 3227–3234.

Xie S, Zhang S, Liu H, Chen G, Feng M, Qin H, Wang F, Yang F 2005. *Effects of processing history and annealing on polymorphic structure of nylon-6/montmorillonite nanocomposites.* Polymer, 46(14): 5417-5427.

# Küçük RNA'ların bakterilerde biyofilm oluşum sürecine etkileri

Melih Aşan[1], Nefise Akçelik[1*], Mustafa Akçelik[2]

[*1]Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Bölümü, Ankara, Türkiye
[2]Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: nakcelik@ankara.edu.tr

## Özet

Biyofilm yapısı, canlı veya cansız bir yüzeye tutunan bakterilerin oluşturdukları topluluğun kendi ürettikleri polimerik matriks içerisinde paketlenmesi sonucu oluşan yaşam formu olarak tanımlanmaktadır. Sahip oldukları bu koruyucu tabaka nedeniyle biyofilm bakterileri; çeşitli çevresel stres koşulları ve konak bağışıklık sistemi başta olmak üzere, antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı da daha dirençli olmaktadır. Son kanıtlar, bakterilerin, biyofilm yapısının oluşumunun ya da hücrelerin planktonik formda canlılıklarını sürdürmesinin kodlama yapmayan küçük RNA'lar (sRNA'lar) tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Çevresel sinyallere cevap olarak sRNA'lar regülatör yolaklarda yer alan proteinlerin ifadesini etkileyerek ya da doğrudan biyofilm oluşumunda rol alan proteinleri regüle etmek suretiyle biyofilm oluşumunu kontrol etmektedir. Biyofilm oluşumu çok sayıda genin regülasyonunun gerçekleştiği kompleks bir süreçtir. Bu süreçte hücrenin büyüme koşullarına bağlı olarak aktive olan sRNA'lar da hedef genlerin transkripsiyonlarını regüle ederek hücrenin hayatta kalma olasılığını artırırlar. sRNA'lar, transkripsiyon, translasyon ve mRNA stabilitesini hem pozitif hem de negatif olarak modüle edebilirler. Bu nedenle biyofilm gelişimi sırasında sRNA'ların rolü çok önemlidir ve bu regülasyonun tam bir resmini elde etmek için biyofilm büyümesi, olgunlaşması ve dağılmasına odaklanan çalışmaların ötesine geçilmesi gerekecektir.
**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, sRNA, CsgD, Hfq.

## Influence of small RNAs on Biofilm Formation Process in Bacteria

## Abstract

The biofilm structure is the life form that occurs when a group of bacteria attached to biotic or abiotic surface is packaged within the polymeric matrix produced by them. Due to this protective layer, biofilm bacteria are also more resistant to antibiotics and disinfectants, particularly various environmental stress conditions and the host immune system. Recent evidences suggest that the formation of biofilm structure or the viability of cells in planktonic form are regulated by non-coding small RNAs (sRNAs). In response to environmental signals, sRNAs control biofilm formation by influencing the expression of proteins in regulatory pathways or directly regulating proteins involved in biofilm formation. Biofilm formation is a complex process in which a large number of genes are regulated. In this process, activated sRNAs, depending on the cell's growth conditions, also regulate transcription of target genes, increasing the likelihood of cell survival. sRNAs can positively and negatively modulate transcription, translation and mRNA stability. Therefore, the role of sRNAs during biofilm development is very important, and to obtain a whole picture of this regulation, studies focusing on biofilm growth, maturation and dispersion will need to be extended

**Keywords:** Biofilm, sRNA, CsgD, Hfq.

## GİRİŞ

Bakteriyel biyofilmler, bakterilerin üretmiş oldukları hücre dışı polimerik maddelerden oluşan bir matriks (EPS) içerisine gömülü halde bulundukları yapılar olarak tanımlanabilir (Flemming ve ark., 2016). Biyofilmler, tek bir veya daha fazla tür bakteriler içerebildiği gibi biyotik ve abiyotik yüzeyler üzerinde oluşabilir. Her ne kadar karma tür biyofilmleri çoğu ortamda baskın olsa da, tek tür biyofilmlerin çeşitli enfeksiyonlarda etkili olduğu bilinmektedir (O'Toole ve ark., 2000). Biyofilm oluşumunun tıbbi ve endüstriyel ortamlarda da önemli bir etkisi bulunmaktadır. Birçok tıbbi ve teknolojik cihazda biyofilm oluşması, insan

sağlığını ve endüstriyel süreçleri etkileyen ciddi karmaşık sorunlara neden olabilir. İnsan dokularında bakteri biyofilminin büyümesi, antibiyotik tedavisine aşırı dirençli olduklarından, antimikrobiyal tedaviler için zorlayıcı kronik enfeksiyonlarla sonuçlanmaktadır (Hatt ve Rather, 2008; Hall-Stoodley ve Stoodley, 2009). Bu nedenle biyofilm oluşum mekanizmalarının anlaşılması, biyofilm yapılarının eradikasyonu açısından çok önemlidir. Moleküler biyolojideki son gelişmelerle, biyofilm oluşumunun altında yatan moleküler temeli anlamak mümkün olmuştur ve biyofilm oluşumunu engellemek için yeni stratejiler ortaya çıkmıştır. Doğada bakteriler ağırlıklı olarak birbirleriyle etkileşime girebildikleri biyofilm popülasyonları olarak yaşamlarını sürdürürler. Bu nedenle, planktonik yaşam formuna göre daha çok biyofilm formu baskın haldedir (Nadell ve ark., 2008).

Biyofilm oluşumu planktonik olarak yaşamına devam eden bakteri hücreleri bir topluluğun parçası olmak için köklü değişikliklere uğrarlar. Bu değişiklikler, biyofilm yapısı içerisinde yaşayan bakteriler tarafından geliştirilen yeni fenotipik özelliklere yansır ve çeşitli çevresel sinyallere cevap olarak ortaya çıkar. Biyofilm matriksinde proteinler (<% 1-2), DNA (<% 1), polisakkaritler (% 1-2), RNA (<% 1) ve bu bileşenlere ek olarak matriks içerisindeki besinlerin akışından sorumlu olan su (% 97'ye varan) bulunur (Jamal ve ark., 2015). Bu matriks biyofilme yapısal stabilite, yapışma ve elastikiyet sağlar (Hengge, 2019). Mikrokoloniler arasında suyun içinden aktığı kanallar mevcuttur. Bu su kanalları, besin maddelerini mikrokolonilere dağıtan ve zararlı metabolitleri uzaklaştıran basit bir dolaşım sistemi olarak işlev görür (Marić ve Vranes, 2007). Hücre dışı polimerik matriks, mikrokolonilerin yüzeye yapışmasını sağlar ve daha sonra, üç boyutlu bir yapı haline gelen biyofilm olgunlaşır (Zhao ve ark., 2017). Biyofilm oluşturma kabiliyeti, çoğu bakteri için evrensel bir özellik olmakla birlikte farklı bakteri türlerinin biyofilm üretmek için kullandıkları mekanizmalar çeşitlilik gösterebilir. Her ne kadar bazı biyofilm yapı bileşenleri ortak olsa da kimyasal olarak farklılıklar mevcuttur. Biyofilm oluşum süreci dinamik ve karmaşıktır (Martínez ve Vadyvaloo, 2014).

Bakterilerde biyofilm oluşumunun regülasyonu QS (quorum sensing) mekanizması, alternatif sigma faktörleri, bis-(3'-5')-siklik-diguanozin monofosfat (c-di-GMP) molekülleri ve çevresel faktörlere bağlı olarak düzenleyici proteinler veya küçük nükleotidler tarafından kontrol edilir (Mika ve Hengge, 2014; Wolska ve ark., 2016). Bakterilerin, ökaryotik organizmalar gibi birbirleri ile iletişim kurmasını gerektiren çeşitli süreçleri kontrol edebilmek için QS adı verilen bir mekanizmayı kullandıkları bilinmektedir. Bu iletişim sürecini, hücre dışına küçük sinyal molekülleri salgılamak ve diğer bakteriler tarafından salgılanan molekülleri algılamak suretiyle gerçekleştirmektedirler (Jayaraman ve Wood, 2008). İkincil mesajcı olarak adlandırılan c-di-GMP molekülleri ise biyofilm yapısına katılacak olanan selülozun üretiminin başlatılmasını sağlarlar. Selüloz, bakterinin hareketliliğini inhibe ederek biyofilm yapısının olgunlaşmasını sağlar (Solano ve ark., 2002; Grantcharova ve ark., 2010). Biyofilm oluşumunun regülasyon sürecine direkt veya dolaylı olarak katılan bir diğer elemanlar ise bakteriyel küçük RNA'lar (sRNA)'dır. sRNA'lar, biyofilm oluşumunda rol alan mRNA'ların ekspresyonunu komplementer baz eşleşmesi yolu ile post-transkripsiyonel düzeyde regüle ederler (Updegrove ve ark., 2016).

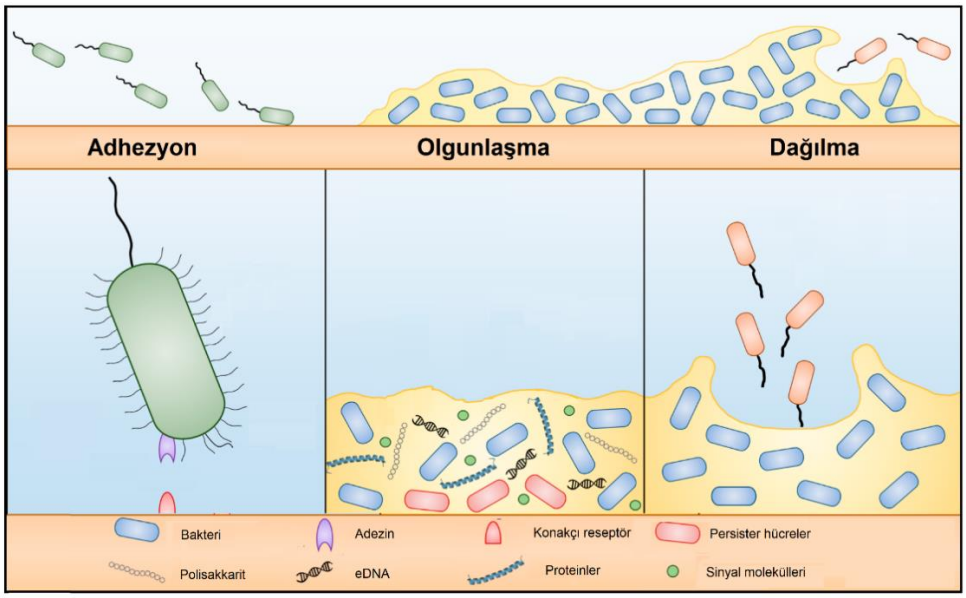
## Bakteriyel Biyofilmler

Bakterilerin çoğu, özel ortamlara adapte olmak için bir biyofilm içerisinde yaşarlar. Biyofilmler, gıda, gıda işleme ekipmanları, su boru hatları, endüstriyel borular, tıbbi cihazlar, insan doku ve organları gibi nemli yüzeylerde gelişebilir (Hall-Stoodley ve Stoodley, 2005). Biyofilm, bir yüzeye yapışmayı içeren bir yaşam formudur ve genellikle birçok bakteriyi içerisinde barındıran bir mimari yapıdır. Bu yapı, konfokal taramalı lazer mikroskoplarının biyofilm araştırmalarında kullanılmasıyla birlikte, bu yapı daha iyi aydınlatılmıştır. Konfokal taramalı lazer mikroskopları kullanılmadan önce, mikrobiyal biyofilmleri yüksek çözünürlükte incelemek için tercih edilen yöntem elektron mikroskopisi idi. Ancak, elektron mikroskobunda görüntü elde edebilmek için numunelerin dehidre edilmesi gerekmektedir. Biyofilm yapılarındaki suyun ortamdan uzaklaştırılması, yapının çökmesine neden olduğundan aldatıcı görüntülerin oluşmasına yol açmıştır. Diğer yandan, tamamen hidratlanmış numunelerin görselleştirilmesine izin veren konfokal taramalı lazer mikroskopisi, biyofilmlerin üç boyutlu yapısını ayrıntılı bir şekilde ortaya koymuştur (Lawrence ve ark., 1991; de Beer ve Stoodley, 1995).

## Bakteriyel Biyofilmlerin Oluşum Aşamaları

Bakterilerde biyofilm oluşumu, uygun bir yaşam alanı elde etmek, besin maddelerini korumak ve hayatta kalmayı sağlamak amacıyla gerçekleşir (Bjarnsholt, 2013). Biyofilm oluşumunun genel mekanizması farklı bakteri türleri arasında benzer olmakla birlikte, türe bağlı olarak ufak farklılıklar içerebilir. Genellikle biyofilm

oluşumu dört aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar; Şekil 1'de gösterilmiş olan ilk yapışma (geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz), mikrokoloni oluşumu, olgunlaşma ve dağılma aşamalarıdır (Khatoon ve ark., 2018).



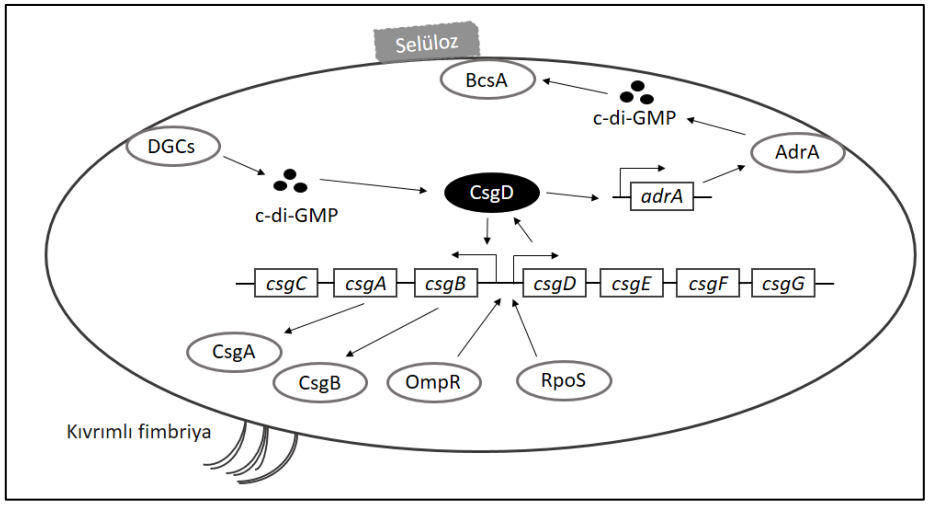

**Şekil 1.** Biyofilm oluşum aşamalarının şeması (Beitelshees ve ark., 2018).

İlk yapışma aşamasında, planktonik formda olan bakteri biyotik veya abiyotik bir yüzeye flagellasını kullanarak ulaşır. Yüzeye ulaştıktan sonra fiziksel kuvvetler veya pili ve flagella gibi bakteriyel uzantılarını kullanarak yapışmayı gerçekleştirirler. Bu aşama geri dönüşümlü bağlanma olarak adlandırılır, çünkü başlangıçta bakteri ile yüzey arasında zayıf etkileşimler mevcuttur. Bu yapışma, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler, adezin proteinleri ve Van der Waals kuvvetleri tarafından yönetilir. Bu esnada bazı bakteriler, yapıştığı yüzeyde meydana gelen itme kuvvetinin üstesinden gelerek hareketsiz kalır ve geri dönüşü olmayan bir şekilde bağlanmış olur. Bu da spesifik bir yapışma ve tek tabaka oluşumu sayesinde gerçekleşir (Veerachamy ve ark., 2014). Örneğin, Stafilokok biyofilmlerinde, yirmiden fazla yüzeye bağlı adhezin proteininin yapışmaya aracılık ettiği bilinmektedir (Speziale ve ark., 2014). Geri dönüşümsüz bağlanma gerçekleştikten sonra, yüzeye yapışan hücreler, biyofilm ilişkili spesifik genlerin ekspresyonu ile sonuçlanan otoindüktör sinyal moleküllerinin üretimi ile kendi aralarında etkileşerek büyür ve olgunlaşır. Bu aşamada bakteri hücrelerini kaplayan EPS'nin salgılanması başlar. Böylece biyofilm yapısı stabilize edilerek bakteriler kendilerini dış etkenlerden (antimikrobiyaller gibi) koruyacak olan bir yapı meydana getirirler. Örneğin, olgunlaşma sırasında *P. aeruginosa*'nın biyofilm yapısının stabilitesini sağlayan üç farklı polisakkarit (aljinat, Pel ve Psl) salgıladığı bilinmektedir. EPS'ye ek olarak, eDNA'nın da hücresel iletişimden ve biyofilmin stabilizasyonundan sorumlu olduğu gözlenmiştir (Gupta ve ark., 2016). Özetle, olgunlaşma aşaması; EPS matriksinin oluşması, hücrelerin bir araya gelmesi, kimyasal etkileşimler, sinyalleşme ve mikro ve makrokolonilerin oluşumunu içerir (von Eiff ve ark., 2005). Biyofilm yapısı olgunlaştıkça bakterilerin kullandığı kaynaklar sınırlı hale gelerek toksik ürünler birikebilir. Bu nedenle, hücreler daha çok besine ulaşmak ve strese neden olan koşulları ve atıkları ortadan kaldırmak için, diğer bölgelere dağılabilir. Hücrelerin dispersiyonu (dağılması), ya tek hücreler olarak ya da biyofilmden ayrılmış hücre kümeleri halinde meydana gelebilir. Bunun oksijen seviyesi (aerobik durumda) veya besin miktarının azalmasıyla gerçekleşen bir süreç olduğu söylenebilir. Serbest hale gelen bakteri hücreleri farklı bölgelerde daha fazla biyofilm oluşturabilir veya hareketliliğinde onlara yardımcı olmak için flagella proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek yüzeyde serbest halde bulunabilirler (Oppenheimer-Shaanan ve ark., 2013; Grande ve ark., 2014).

## Biyofilm Oluşumunun Regülasyonu

Biyofilm oluşumu ve dağılımı, çevresel sinyallerle düzenlenen dinamik bir süreçtir. Güncel bilgiler, Gram negatif bakterilerin çoğunda, biyofilm oluşumunun ana düzenleyicileri olarak QS sisteminin, c-di-GMP moleküllerinin ve sRNA'ların olduğunu işaret etmektedir (Fazli ve ark., 2014). QS, hücreler arası iletişim için kullanılan ve otoindüktör (AI) olarak adlandırılan bakterinin kendi ürettiği küçük, sinyal moleküllerine dayanan özel bir dil olarak kabul edilir. Populasyondaki bakteri sayısına bağlı olarak otoindüktörlerin konsantrasyonu bir eşik seviyesine ulaştığında, bakteriler kritik kütlelerini hissetmeye ve hedef genleri baskılayarak veya aktive ederek cevap vermeye başlar (Bramhachari, 2018) QS sistemi, bakteriyel

biyofilmlerin geliştirilmesi ve yayılması sırasında çok önemli bir rol oynar. Bu sistem yapışma ve başlangıçta biyofilmin büyüme aşamasında yer almasa da, daha fazla biyofilm gelişimi için gereklidir ve biyofilm dağılımının ana düzenleyicisidir (Davies ve ark., 1998). Diğer bir biyofilm regülatörü olan c-di-GMP sinyalizasyonu, bakterilerde bulunan en karmaşık ikincil sinyal sistemi olarak kabul edilir. Bununla birlikte, karmaşıklığı önemli ölçüde değişir ve bu tür sinyaller bazı bakterilerde bulunmayabilir (Römling ve Balsalobre, 2012). c-di-GMP molekülleri, çeşitli hücresel reseptörlere bağlandıktan sonra, transkripsiyonu, enzimlerin aktivitesini ve hatta daha büyük hücresel yapıların işleyişini kontrol edebilir (Hengge, 2009). c-di-GMP, planktonik ve biyofilm ile ilişkili yaşam tarzı arasındaki geçişte önemli bir rol oynar (Jenal ve Malone, 2006). c-di-GMP tarafından düzenlenen ve üç boyutlu biyofilm yapı gelişimi için önemli olan faktörler mevcuttur. Bunlar; ekzopolisakkaritlerin sentezi, pili ve adezinler, eDNA'nın salgılanması ve hücre ölümünün ve hareketliliğinin kontrolünün sağlanmasıdır (Srivastava ve Waters, 2012). Biyofilm oluşumunun ana düzenleyicisi olan CsgD proteini, *Escherichia coli*'de ve *Salmonella* Typhimurium'da kıvrımlı fimbriya ve hücre dışı polisakkaritlerin sentezini aktive eder (Şekil 2). CsgD, bakteriyel c- di-GMP'nin sentezi için bir enzimi kodlayan *adrA* genini aktive eder ve bu da flagellum üretimini ve rotasyonunu inhibe eder (Ogasawara ve ark., 2011). Bu nedenle, CsgD, hücre hareketliliğinin kontrolü ve yapışmada yer alan genlerin ekspresyonunu koordine ederek planktonik ve biyofilm yaşam formu arasında bir geçiş görevi görür (Liu ve ark., 2014). Son olarak, küçük kodlayıcı olmayan RNA moleküllerinin, biyofilm oluşumunda ve çevresel faktörlerin neden olduğu stres koşullarına adaptasyon için transkripsiyon sonrası gen düzenlemesine katıldığı gösterilmiştir (Mandin ve Guillier, 2013).

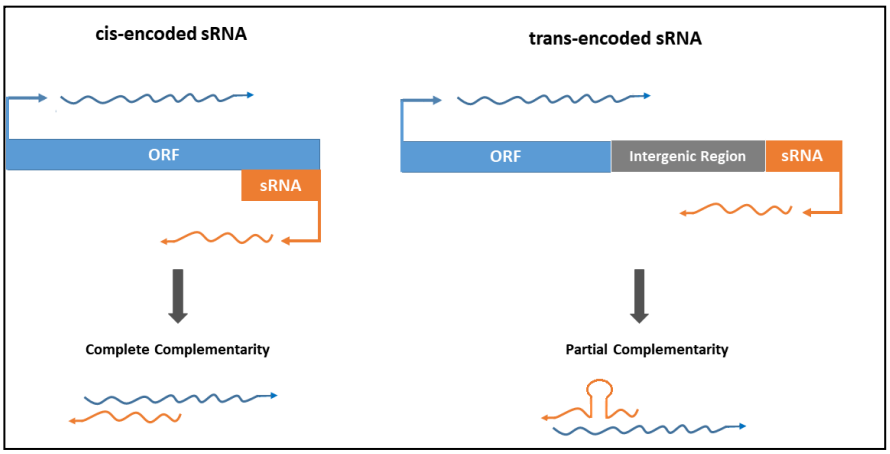



**Şekil 2.** *Salmonella* Typhimurium'da CsgD aracılı biyofilm oluşumunun transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi. CsgD ekspresyonu, alternatif sigma faktörü RpoS ve OmpR'yi gerektirir. CsgD, kıvrımlı fimbriyalar için yapısal alt birimleri kodlayan *csgBAC* operonunun transkripsiyonunu ve selüloz biyosentezinin aktivasyonu için gereken di-guanilat siklazların üretilmesi için *adrA*'nın transkripsiyonunu sağlar. Ayrıca CsgD ekspresyonu, c-di-GMP molekülleri tarafından pozitif regüle edilebilir (Grantcharova ve ark., 2010).

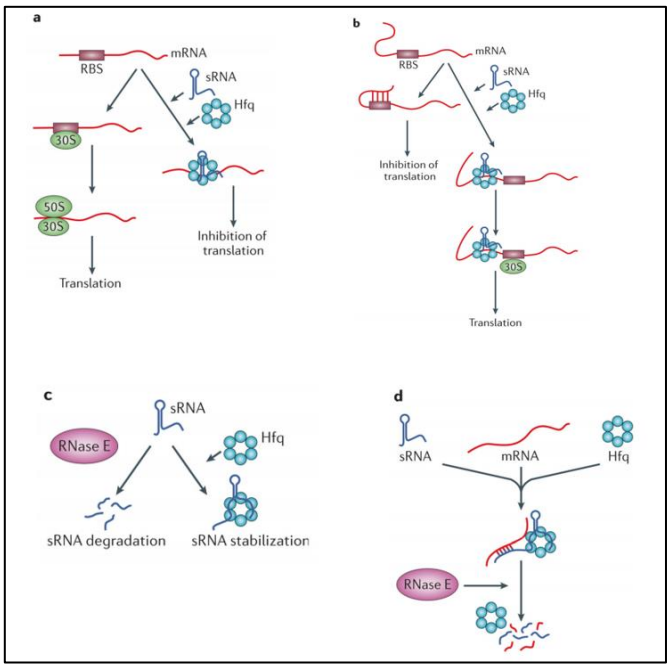
## Bakteriyel sRNA'lar

Bakterilerde sRNA'lar yaklaşık 30-500 nükleotid uzunluğundadır ve genellikle stres koşullarında hücresel metabolizmadaki değişikliklerin modüle edilmesine yardımcı olurlar, bu da mevcut besinlerin kullanımını optimize eder ve bakterinin hayatta kalma olasılığını arttırır. Bu regülatör RNA'lar transkripsiyonu, translasyonu ve mRNA stabilitesini modüle edebilirler. Bu modülasyonu; RNA konformasyonundaki değişiklikler yaparak, proteinlere bağlanarak, diğer RNA'larla baz eşleşmesi yaparak ve DNA ile etkileşime girerek gerçekleştirebilirler (Waters ve Storz, 2009). sRNA'ların çoğu hedef mRNA'larla baz eşleşmesi gerçekleştirerek etki ederler. Bu baz eşleşmesi yapan sRNA'lar trans-kodlanmış ve cis-kodlanmış olarak iki kategoriye ayrılır (Şekil 3). Trans-kodlanmış sRNA'lar, düzenledikleri mRNA'lardan uzak olan genomik konumlarda kodlanır ve bu nedenle genellikle hedefleriyle sınırlı bir komplementerlik paylaşırlar. Bu nedenle, trans-kodlanmış sRNA'ların çoğunun birden fazla mRNA hedefi vardır. Bazı bakterilerde, bu tip baz eşleşmeler, RNA şaperonu olan Hfq proteinini gerektirir. Hfq, bakterilerde yaygın olarak bulunan ve gen

ekspresyonunun kontrolünde anahtar rolleri olan RNA'ya bağlanabilen bir proteindir. Hfq, küçük RNA'ların hedef mRNA'larıyla eşleşmesini kolaylaştırarak spesifik transkriptlerin translasyonunu etkiler. Şimdiye kadar trans-kodlanmış sRNA'lar en yaygın olarak karakterize edilen sRNA'lardır. cis-kodlanmış sRNA'lar üzerinde ise daha az çalışma mevcuttur. cis-kodlanmış sRNA'lar, bakteri kromozomları üzerinde hedef genlerinin karşı zincirinden transkribe olurlar ve bu nedenle hedefleri ile yüksek düzeyde komplementerlik gösterirler (Thomason ve Storz, 2010). Baz eşleşmesi yoluyla etki eden sRNA'lar; Şekil 4'te gösterildiği üzere Ribozom Bağlanma Bölgesi'ne erişimi değiştirebilirler, Ribonükleaz (RNaz) aracılı degradasyonu teşvik edebilirler, mRNA'nın ikincil yapısını değiştirebilirler ve mRNA'larda bulunan protein bağlanma sekanslarını taklit edebilirler (Waters ve Storz, 2009).



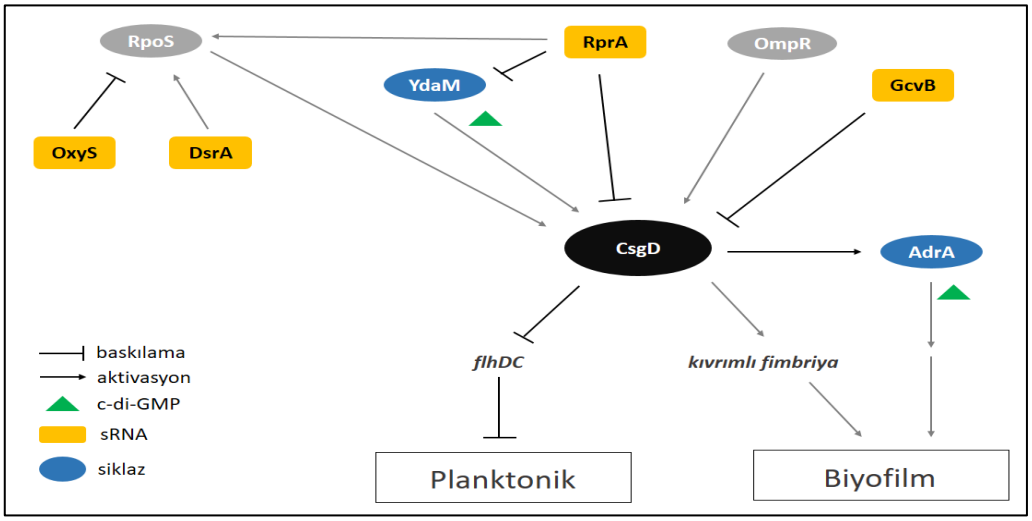

**Şekil 3.** Trans-kodlanmış ve cis-kodlanmış sRNA'ların genomik lokasyon farklılıkları. Turuncu kutular sRNA'yı, mavi kutular hedef mRNA'yı ve gri kutu intergenik bölgeyi göstermektedir (Prasse ve ark., 2013).




**Şekil 4.** Küçük RNA'ların Hfq ile ilişkisi ve hedef mRNA'larına etki mekanizmaları. **a)** Hfq-sRNA kompleksi hedef mRNA'nın ribozom bağlanma bölgesini (RBS) etkisiz hale getirebilir, böylece 30S ve 50S ribozomal alt birimlerinin bağlanmasını bloke edebilir ve translasyonu baskılayabilir. **b)** Bazı mRNA'larda, 5' translasyona uğramayan bölgedeki (UTR) sekonder bir yapının varlığı, ribozom bağlanma bölgesini gizleyebilir ve translasyonu engelleyebilir. Hfq-sRNA kompleksi, ribozom bağlanma bölgesini açığa çıkararak bu mRNA'nın translasyonunu aktive edebilir. **c)** Hfq, bazı sRNA'ları, pek çok durumda Ribonükleaz E (RNaz E) tarafından gerçekleştirilen degradasyondan koruyabilir. **d)** Hfq, bazı sRNA'ların ve hedef mRNA'larının degradasyonunu RNaz E aracılığı ile indükleyebilir (Vogel ve Luisi, 2011).

## sRNA'ların Biyofilm Oluşumuna Etkileri

Biyofilm sentezi çok sayıda genin regülasyonunun gerçekleştiği kompleks bir süreçtir. Flagella yapısı bakteri hücresinin yüzeye ulaşmasında ve biyofilm oluşumunun diğer aşamalarında rol alan bir yapıdır ve bu yapının sentezinden sorumlu ana regülatör FlhDC'dir. Kıvrımlı fimbriya uzantıları gibi proteinler ve PGA gibi ekzopolisakkaritler hücrelerin birbiriyle ve yüzeyle ilişki kurmalarını sağlamanın yanı sıra, bakterilerin etrafında matriks yapısının oluşmasına da katkıda bulunur (Liu ve ark., 2014). Kıvrımlı fimbriya sentezinin transkripsiyonel regülatörü daha önce de ifade edildiği üzere CsgD'dir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, CsgD ekspresyonunun sRNA'lar ve RNA şaperonu Hfq tarafından da kontrol edildiği belirlenmiştir (Monteiro ve ark., 2012). Bu sRNA'lar, özellikle stres koşullarında transkripsiyon sonrasında protein sentezini doğrudan etkileyen ve gen ekspresyonuna önemli etkileri bulunan regülatörlerdir. sRNA'lar iki temel mekanizma ile biyofilm oluşumunu regüle ederler: (i) Diğer RNA'lar ile baz eşleşmesi yaparak (ii) Proteinlere bağlanarak. Proteinlere bağlanan sRNA'lar pek çok mRNA'da bulunan protein bağlanma bölgelerini taklit ederek regülatör proteinlerin mRNA'ya bağlanmasını engeller (Fröhlich ve Vogel, 2009). Şekil 5'te gösterildiği üzere sRNA'ların biyofilm oluşumunun genetik regülasyonuna katıldığı ve FlhDC ve CsgD ifadesini düzenlediği bilinmektedir (Mika ve Hengge, 2014). Ayrıca Hfq bağımlı sRNA'ların çeşitli stres koşullarına cevap olarak, kıvrımlı fimbriya sentezinde, hücre hareketliliğinin regülasyonunda ve biyofilm oluşumunda önemli olduğu bilinen neredeyse bütün yolaklarda kilit rollere sahiptir (Chambers ve Sauer, 2013). sRNA'ların biyofilm oluşumunda rol alan genler üzerindeki regülasyon karakteristikleri, farklı bakteri grupları kullanılarak çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Örneğin, *E. coli*'de biyofilm oluşumu ile ilgili yüze yakın sRNA tanımlanmıştır ve bu sRNA'ların biyofilm oluşumu ile ilgili fenotiplere etkisi belirlenmiştir (Bak ve ark., 2015).




**Şekil 5.** CsgD'yi kontrol eden genetik mekanizmaların biyofilm oluşumu ve hücre hareketliliği üzerine etkisi. CsgD'nin ekspresyonu, transkripsiyonel seviyede, alternatif sigma faktörü RpoS, transkripsiyonel regülatör protein OmpR ve dolaylı olarak c-di-GMP (siklik di-guanilat monofosfat) seviyelerine bağlı olarak di-guanilat siklaz YdaM tarafından kontrol edilir. Ayrıca CsgD ifadesi, çevresel faktörlerin etkisiyle uyarılan çeşitli sRNA'lar vasıtasıyla transkripsiyon sonrası da regüle edilmektedir. CsgD'nin regülasyonu OxyS, RprA ve GcvB tarafından negatif regüle edilirken, DsrA tarafından pozitif regüle edilir. CsgD'nin aktivasyonu, planktonik yaşam tarzıyla ilişkili genleri baskılar (örneğin *flhDC*) ve kıvrımlı fimbriya ve selüloz gibi yüzeye bağlı büyüme ile ilişkili genleri aktive eder (Chambers ve Sauer, 2013).

DsrA, transkripsiyonel regülatör olan RpoS'nin translasyonunu düzenlediği bilinen yaklaşık 87 nükleotid uzunluğunda bir sRNA'dır. DsrA, düşük sıcaklıkta indüklenerek bakterinin soğuğa karşı dirençli olmasına katkı sağlar (Lease ve Belfort, 2000). DsrA, doğrudan *rpoS* mRNA'nın translasyonunu uyarır ve FlhDC ifadesinin dolaylı bir aktivatörü olarak etki eder (Mika ve Hengge, 2014). DsrA'nın bu fonksiyonlarının sonucu olarak *E. coli*'de aşırı ekspresyonunun biyofilm oluşumunu önemli derecede artırdığı bilinmektedir. Buna karşılık DsrA'nın delesyonu ise biyofilm oluşumunu azaltır (Parker ve ark., 2017). Bir başka çalışmada ise, *E. coli*'de DsrA'nın aşırı ekspresyonunun biyofilm oluşumunu azalttığı ve DsrA'nın delesyonunun biyofilm oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (Bak ve ark., 2015). DsrA'nın biyofilm oluşumundaki rolünün belirlenmesi çalışmalarında farklı sonuçların elde edilmesinin bakterileri gelişme koşullarındaki farklılıklardan

kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Parker ve ark., 2017). RprA, ozmotik şoka cevap olarak RpoS üretimi için gerekli olan küçük düzenleyici RNA'dır (Majdalani ve ark., 2001). RprA'nın, durağan fazda ekspresyonu gerçekleşir ve ekspresyonu RcsC-RcsB sistemi tarafından aktive edilir (Hu ve ark., 2013). RprA'nın aşırı ifadesinin asit toleransını artırdığı gösterilmiştir (Bak ve ark., 2014). Hem DsrA hem de RprA, RpoS translasyonunu kolaylaştırmak ve *rpoS* mRNA'nın hem birikimini hem de yarı ömrünü artırmak için *rpoS* mRNA'nın lider dizisindeki ikincil yapıyı değiştirirler (Majdalani ve ark., 2002; McCullen ve ark., 2010) Ayrıca *E. coli*'de RprA, CsgD ve YdaM ifadesini negatif olarak düzenler. RprA'nın aşırı ekspresyonu *csgD* mRNA miktarını doğrudan azaltır veya YdaM ifadesini düşürerek dolaylı olarak csgD ifadesini de azaltmış olur (Jørgensen ve ark., 2012; Mika ve ark., 2012) Buna bağlı olarak da RprA'nın biyofilm oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Bak ve ark., 2015). GcvB, aminoasit metabolizmasının regülasyonunu sağlayan yaklaşık 205 nükleotit uzunluğunda olan küçük RNA'dır (Argaman ve ark., 2001). GcvB'nin transkripsiyonu, GcvA tarafından uyarılır (Urbanowski ve ark., 2000). GcvB'nin, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da periplazmik taşıyıcı bileşenleri olan *dppA* ve *oppA* mRNA'larına bağlanarak translasyonu engellediği bilinmektedir. *E. coli*'de ise GcvB'nin, RpoS'nin ifadesini artırdığı ancak *csgD* mRNA'sına bağlanarak translasyonunu engellediği belirlenmiştir (Jin ve ark., 2009). GcvB'nin bu fonksiyonlarının, *E. coli*'de biyofilm oluşumunu artırdığı ve hareketliliği azalttığı belirlenmiştir (Bak ve ark., 2015). OxyS ise oksidatif strese bağlı olarak ekspresyonu gerçekleşen ve transkripsiyonel olarak OxyR tarafından aktive edilen, yaklaşık 110 nükleotit uzunluğundaki küçük bir RNA'dır. *E. coli*'de, RprA'nın aksine OxyS, RpoS'nin translasyonunu baskılar (Altuvia ve ark., 1997; Zhang ve ark., 1998). Ayrıca FlhDC ekspresyonunu azaltarak flagella sentezini inhibe eder (De Lay ve Gottesman, 2012). Buna bağlı olarak OxyS'nin aşırı ekspresyonunun kıvrımlı fimbriya sentezini ve *E. coli* hareketliliğini azalttığı bilinmektedir (Bak ve ark., 2015).

## SONUÇ

Biyofilm gelişimi çevreye özgü gerekliliklere göre dinamik olarak düzenlenen bir süreçtir. Bu sürece dahil olan sRNA'lar, transkripsiyon, translasyon ve mRNA stabilitesini hem pozitif hem de negatif olarak regüle ederek bakterinin yaşama olasılığını artırmaya aracılık eder. sRNA'lar hücre hareketliliği ve hücre dışı matriks üretimini düzenleyerek biyofilm oluşumunu teşvik edebilir veya inhibe edebilir. Bu nedenle biyofilm gelişimi sırasında sRNA regülasyonu çok önemlidir ve bu regülasyonun tam bir resmini elde etmek için biyofilm büyümesi, olgunlaşması ve dağılmasına odaklanan çalışmaların gerçekleştirilmesi gereklidir**.**

## KAYNAKLAR

1. Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L, Storz G (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. Cell 90, 43–53.
2. Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, Altuvia S (2001) Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli. Current biology: CB 11, 941–950.
3. Bak G, Han K, Kim D, Lee Y (2014) Roles of rpoS-activating small RNAs in pathways leading to acid resistance of Escherichia coli. MicrobiologyOpen 3, 15–28.
4. Bak G, Lee J, Suk S, Kim D, Young Lee J, Kim K-S, Choi B-S, Lee Y (2015) Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in Escherichia coli. Scientific Reports 5, 15287.
5. Beer D de, Stoodley P (1995) Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. Water Science and Technology, Biofilm Structure, Growth and Dynamics 32, 11–18.
6. Beitelshees, M., Hill, A., Jones, C. H., Pfeifer, B. A. 2018. "Phenotypic Variation during Biofilm Formation: Implications for Anti-Biofilm Therapeutic Design". Materials, 11(7), 1086.
7. Bjarnsholt T (2013) The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS. Supplementum 1–51.
8. Bramhachari PV (ed.) (2018) Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence. Springer Singapore.
9. Chambers JR, Sauer K (2013) Small RNAs and their role in biofilm formation. Trends in microbiology 21, 39–49.
10. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science (New York, N.Y.) 280, 295–298.
11. De Lay N, Gottesman S (2012) A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in Escherichia coli. Molecular Microbiology 86, 524–538.

12. Eiff C von, Jansen B, Kohnen W, Becker K (2005) Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. Drugs 65, 179–214.
13. Fazli M, Almblad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T (2014) Regulation of biofilm formation in Pseudomonas and Burkholderia species. Environmental Microbiology 16, 1961–1981.
14. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology 14, 563–575.
15. Fröhlich KS, Vogel J (2009) Activation of gene expression by small RNA. Current Opinion in Microbiology 12, 674–682.
16. Grande R, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Longwell M, Iannitelli A, Cellini L, Di Stefano A, Hall Stoodley L, Stoodley P (2014) Temporal expression of agrB, cidA, and alsS in the early development of Staphylococcus aureus UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. Pathogens and Disease 70, 414–422.
17. Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Römling U (2010) Bistable Expression of CsgD in Biofilm Development of Salmonella enterica Serovar Typhimurium. Journal of Bacteriology 192, 456–466.
18. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P (2016) Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. Archives of Microbiology 198, 1–15.
19. Hall-Stoodley L, Stoodley P (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends in Microbiology 13, 7–10.
20. Hall-Stoodley L, Stoodley P (2009) Evolving concepts in biofilm infections. Cellular Microbiology 11, 1034–1043.
21. Hatt JK, Rather PN (2008) Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. Current Topics in Microbiology and Immunology 322, 163–192.
22. Hengge R (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. Nature Reviews. Microbiology 7, 263–273.
23. Hengge R (2019) Targeting Bacterial Biofilms by the Green Tea Polyphenol EGCG. Molecules (Basel, Switzerland) 24.
24. Hu LI, Chi BK, Kuhn ML, Filippova EV, Walker-Peddakotla AJ, Bäsell K, Becher D, Anderson WF, Antelmann H, Wolfe AJ (2013) Acetylation of the response regulator RcsB controls transcription from a small RNA promoter. Journal of Bacteriology 195, 4174–4186.
25. Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S (2015) Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology 4, 1–14.
26. Jayaraman A, Wood TK (2008) Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Annual Review of Biomedical Engineering 10, 145–167.
27. Jenal U, Malone J (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. Annual Review of Genetics 40, 385–407.
28. Jin Y, Watt RM, Danchin A, Huang J (2009) Small noncoding RNA GcvB is a novel regulator of acid resistance in Escherichia coli. BMC genomics 10, 165.
29. Jørgensen MG, Nielsen JS, Boysen A, Franch T, Møller-Jensen J, Valentin-Hansen P (2012) Small regulatory RNAs control the multi-cellular adhesive lifestyle of Escherichia coli. Molecular Microbiology 84, 36–50.
30. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah T-F, Alarcon EI (2018) Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. Heliyon 4, e01067.
31. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. Journal of Bacteriology 173, 6558–6567.
32. Lease RA, Belfort M (2000) A trans-acting RNA as a control switch in Escherichia coli: DsrA modulates function by forming alternative structures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 9919–9924.
33. Liu Z, Niu H, Wu S, Huang R (2014) CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. Emerging Microbes & Infections 3, e1.
34. Majdalani N, Chen S, Murrow J, St John K, Gottesman S (2001) Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. Molecular Microbiology 39, 1382–1394.

35. Majdalani N, Hernandez D, Gottesman S (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. Molecular Microbiology 46, 813–826.
36. Mandin P, Guillier M (2013) Expanding control in bacteria: interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression. Current Opinion in Microbiology, Cell regulation 16, 125–132.
37. Marić S, Vranes J (2007) Characteristics and significance of microbial biofilm formation. Periodicum Biologorum 109, 115–121.
38. Martínez LC, Vadyvaloo V (2014) Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 4.
39. McCullen CA, Benhammou JN, Majdalani N, Gottesman S (2010) Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation. Journal of Bacteriology 192, 5559–5571.
40. Mika F, Busse S, Possling A, Berkholz J, Tschowri N, Sommerfeldt N, Pruteanu M, Hengge R (2012) Targeting of csgD by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in Escherichia coli. Molecular Microbiology 84, 51–65.
41. Mika F, Hengge R (2014) Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of Escherichia coli. RNA Biology 11, 494–507.
42. Monteiro C, Papenfort K, Hentrich K, Ahmad I, Le Guyon S, Reimann R, Grantcharova N, Römling U (2012) Hfq and Hfq-dependent small RNAs are major contributors to multicellular development in Salmonella enterica serovar Typhimurium. RNA biology 9, 489–502.
43. Nadell CD, Bassler BL, Levin SA (2008) Observing bacteria through the lens of social evolution. Journal of Biology 7, 27.
44. Ogasawara H, Yamamoto K, Ishihama A (2011) Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis. Journal of Bacteriology 193, 2587–2597.
45. Oppenheimer-Shaanan Y, Steinberg N, Kolodkin-Gal I (2013) Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. Trends in Microbiology 21, 594–601.
46. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology 54, 49–79.
47. Parker A, Cureoglu S, De Lay N, Majdalani N, Gottesman S (2017) Alternative pathways for Escherichia coli biofilm formation revealed by sRNA overproduction. Molecular Microbiology 105, 309–325.
48. Prasse D, Ehlers C, Backofen R, Schmitz RA (2013) Regulatory RNAs in archaea: first target identification in Methanoarchaea. Biochemical Society transactions.
49. Römling U, Balsalobre C (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. Journal of Internal Medicine 272, 541–561.
50. Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo J-M, Gamazo C, Lasa I (2002) Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. Molecular Microbiology 43, 793–808.
51. Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, Geoghegan JA (2014) Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 4, 171.
52. Srivastava D, Waters CM (2012) A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic Di-GMP. Journal of Bacteriology 194, 4485–4493.
53. Thomason MK, Storz G (2010) Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? Annual Review of Genetics 44, 167–188.
54. Updegrove TB, Zhang A, Storz G (2016) Hfq: the flexible RNA matchmaker. Current opinion in microbiology 30, 133–138.
55. Urbanowski ML, Stauffer LT, Stauffer GV (2000) The gcvB gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in Escherichia coli. Molecular Microbiology 37, 856–868.
56. Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK (2014) Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine 228, 1083–1099.
57. Vogel J, Luisi BF (2011) Hfq and its constellation of RNA. Nature reviews. Microbiology 9, 578–589.
58. Waters LS, Storz G (2009) Regulatory RNAs in bacteria. Cell 136, 615–628.

59. Wolska KI, Grudniak AM, Rudnicka Z, Markowska K (2016) Genetic control of bacterial biofilms. Journal of Applied Genetics 57, 225–238.
60. Zhang A, Altuvia S, Tiwari A, Argaman L, Hengge-Aronis R, Storz G (1998) The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. The EMBO journal 17, 6061–6068.
61. Zhao X, Zhao F, Wang J, Zhong N (2017) Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. RSC Advances 7, 36670–36683.

# Detection of breakpoint in pome fruit growth using piecewise linear regression

Ersin Atay[1*], A. Nilgün Atay[1]

[*1]Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Food Agriculture and Livestock School, Department of Crop and Livestock Production, Horticulture Programme, Burdur, Turkey.

*Corresponding author e-mail: ersinatay@mehmetakif.edu.tr

## Abstract

In fruit trees, understanding fruit growth and development is fundamental for manipulating the growth and maximizing yield. In the present study, piecewise linear regression models of the fruit grown in four pome fruit species (apple, pear, quince, and medlar) were obtained. The results implied that the piecewise linear regression models could reveal the time when the growth of fruit diameter changed abruptly.

**Keywords:** dependent variable (*y*), interpretation, linear models, simple linear regression.

## INTRODUCTION

Pome fruit trees (such as apple, pear, quince, medlar, loquat, hawthorn and rowan) are members of sub-family *Pomoideae* of *Rosaceae* family. They are in the accessory fruit category, in which edible parts surround the core of fruit. Measuring fruit diameter throughout the season provides growers to reveal fruit growth determined by genetic, cultural and environmental factors (Atay et al., 2010). Thus, the fruit growth pattern is crucial for the prediction of yield and fruit quality at harvest (Zadravec et al., 2014). Monitoring of fruit growth continuously can help to imply cultural practices (such as irrigation, mineral nutrition, pruning and thinning) efficiently for profitable production (Westwood, 1995). This study was made to estimate the breakpoint from the rapid to low fruit growth phase using a current statistical approach named piecewise linear regression (PLR). PLR reveals multiple linear segments in the *x*-axis to be fit to the *y*-axis (Ryan and Porth, 2007). Thus, single linear regression models may not proper to provide this critical information.

## MATERIALS AND METHODS

This study was carried out at the Fruit Research Institute (MAREM), located in the Mediterranean area of Turkey (altitude 919 m). The four pome fruit species (apple, pear, quince and medlar) were used as plant material. The rootstock-cultivar combinations were 'Golden Delicious'/M.9, 'Akça'/Q.A, 'Eşme'/Q.A and 'İstanbul'/Q.A for apple, pear, quince and medlar, respectively. For each species, five mature trees were selected. All orchard management practices were decided by MAREM's farm manager in according to commercial practices in the region. Fruit diameter was measured using a digital caliper at 6-10 days intervals during the fruit growth. Twenty fruit in each measurement day were chosen randomly. Data for each species were analyzed using the software SegReg (http://www.waterlog.info/pdf/regtxt.pdf). Linear regression and piecewise linear regression models were performed to compose fruit growth pattern.

## RESULTS and DISCUSSION

Fruit of apple, pear, quince, and medlar were harvested at 151, 83, 173, and 171 days after full bloom (DAFB), respectively. For each species, linear regression models are given in Figure 1. Because we chose the fruit randomly at each measurement day, an inconsistent growth pattern in some particular periods was seen. However, considering the whole period, a clear growth pattern was observed.

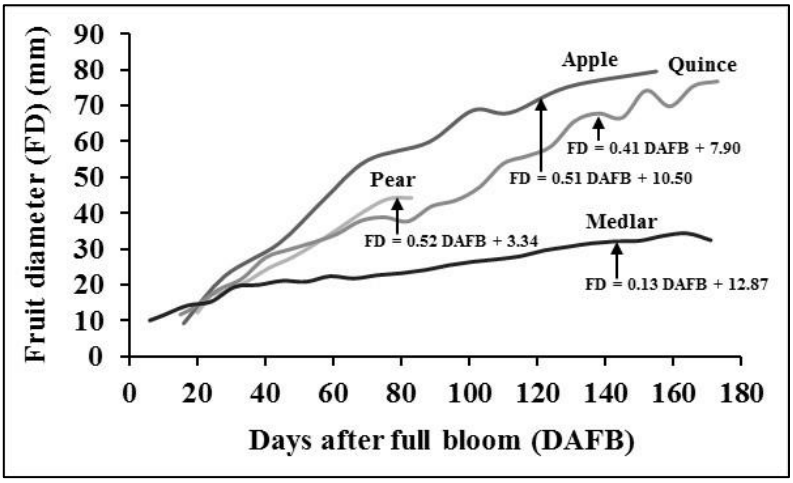



**Figure 1.** Simple linear regression models based on the time-dependent changes of fruit diameter of four different pome fruit species. The full bloom dates are 25 April, 24 April, 3 May, 12 May for apple ('Golden Delicious'/M.9), pear ('Akça'/Q.A), quince ('Eşme'/Q.A), and medlar ('İstanbul'/Q.A), respectively.

In PLR models, the breakpoint and its day were 74.3 mm and 106 DAFB, 43.5 mm and 74 DAFB, 73.3 mm and 156 DAFB, and 32.9 mm and 136 DAFB in apple, pear, quince, and medlar, respectively. The slope was 0.68, 0.62, 0.43, and 0.16 for apple, pear, quince, and medlar (respectively) when fruit diameter is smaller than breakpoint (Figure 2). PLR models could detect an abrupt change in fruit growth (Li et al., 2014). In a study on 'Golden Delicious'/M.9 apple, the breakpoint of fruit diameter growth was around 74 mm (Atay and Koyuncu, 2017). Knowing when the breakpoint happens during fruit growth period could be helpful to growers to schedule orchard practices precisely.

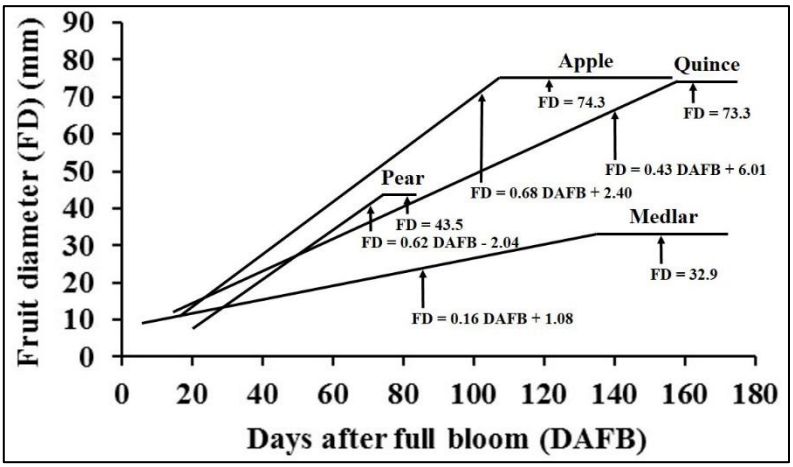



**Figure 2.** PLR models based on time-dependant changes of fruit diameter of four different pome fruit species. The full bloom dates are 25 April, 24 April, 3 May, 12 May for apple ('Golden Delicious'/M.9), pear ('Akça'/Q.A), quince ('Eşme'/Q.A), and medlar ('İstanbul'/Q.A), respectively. PLR: Piecewise linear regression.

## CONCLUSION

The application of PLR to determine growth breakpoint of fruit diameter is to be rewarded for growers. Thus, fruit diameter is an essential component of fruit quality that dictates the fruit price at the market. The accurate assessments of breakpoint of fruit diameter could be used to improve the efficiency of orchard practices. In summary, there were substantial differences for the models of fruit growth among the linear regression and PLR.

**REFERENCES**

Atay E, Pırlak L, Atay AN 2010. Determination of fruit growth in some apple varieties. Tarım Bilimleri Dergisi - Journal of Agricultural Sciences, 16(1): 1-8.

Atay AN, Koyuncu F 2017. Impact of repeated yearly applications of prohexadione-calcium on vegetative and reproductive growth of 'Golden Delicious'/M.9 apple trees. Journal of Horticultural Research, 25(1): 47-54. DOI: 10.1515/johr-2017-0005.

Li N, Zhang L, Yan Q, Xue Y 2007. Application of piecewise linear regression in the detection of vegetation greenness trends on the Tibetan Plateau. International Journal of Remote Sensing, 35(4): 1526-1539. DOI: 10.1080/01431161.2013.878066.

Ryan SE, Porth LS 2007. A tutorial on the piecewise regression approach applied to bedload transport data. General Technical Report RMRS-GTR-189. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 41 p.

Westwood MN 1995. Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture (Third Edition). Oregon, USA, Timber Press.

Zadravec P, Veberic R, Stampar F, Schmitzer V, Eler K 2014. Fruit growth patterns of four apple cultivars using nonlinear growth models. European Journal of Horticultural Science, 79(2): 52-59.

# Synthesis and characterization of novel 5-substituted isatins-thiosemicarbazone including methyl benzoate

Halit Muğlu

University of Kastamonu, Faculty of Science, Department of Chemistry, Kastamonu, Turkey.

Corresponding author e-mail: hmuglu@kastamonu.edu.tr

**Abstract**

Firstly, thiosemicarbohydrazides were obtained from hydrazine monohydrate and aryl isothiocyanate. A new series of isatin derivatives were synthesized by treatment of 5-substituted isatin derivatives with thiosemicarbohydrazide including methyl benzoate under reflux in ethanol. The chemical structures of the compounds were characterized by using IR, $^{1}H$ and $^{13}C$ NMR spectroscopic techniques and by elemental analysis.

**Keywords:** Isatin, Thiosemicarbohydrazide, Spectroscopic Techniques.

## INTRODUCTION

Isatins (indole-2,3-dione) are an significant class of organic chemistry. They have become a popular topic owing to its biological activity and application in pharmaceutical chemistry such as anti-microbial (El-Faham et al., 2015), anti-oxidant (Haribabu et al., 2016), antibacterial (Chohan et al., 2004), anti-tubercular (Aboul-Fadl and Bin-Jubair, 2010), anti-HIV (Bal et al., 2005), anti-cancer (Ali et al., 2017).

Thiosemicarbazones are a substantial class of organic compounds, have diversity of medicinal and biological applications (Liu et al., 1996; Hu et al., 2006; Kumar et al., 2010; Almutairi et al., 2018). They have revealed wide spectrum of activities which includes anti-cancer (Hu et al., 2006), anti-HIV (Banerjee et al., 2011), antioxidant (Bingul et al., 2019), anti-inflammatory (Hall et al., 1996), anti-fungal (Pervez et al., 2008), enzymatic inhibition (Kumar et al., 2010), and anti-bacterial (Pervez et al., 2008).

We report that a new series of isatin derivatives were synthesized by treatment of 5-substituted isatin derivatives with thiosemicarbohydrazide including methyl benzoate in ethanol containing one drop of hydrocloric acid at reflux for 3 h. The chemical structures of the compounds were confirmed by means of IR, $^{1}H$, and $^{13}C$ NMR spectroscopy and by elemental analysis.

## MATERIALS AND METHODS

### Measurement and reagents

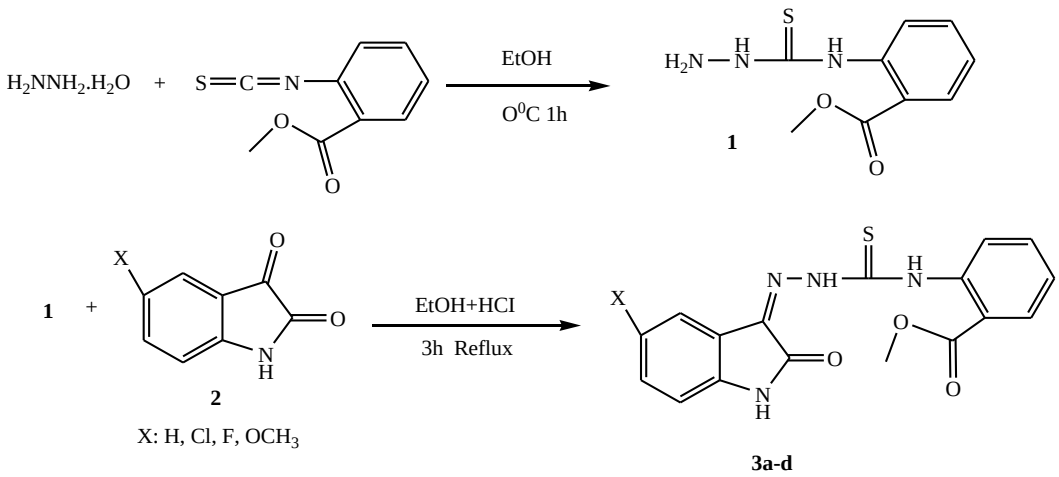
All starting materials and solvent were purchased from Aldrich, Sigma, or Merck Chemical Company and were used without further purification. The solvent was spectroscopic grade. The elemental analysis was performed on a CHNS-932 (LECO). Infrared spectra were recorded on a Bruker Alpha FT-IR spectrometer. $^{1}H$ NMR and $^{13}C$ NMR spectra were taken on a JEOL ECX-400 (400 MHz) in DMSO-$d_6$ spectrophotometer. The splitting patterns are indicated as s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), t (triplet), q (quartet), and m (multiplied). Melting points were measured using a Gallenkamp melting point apparatus and were uncorrected. Absorption measurements were recorded with a SHIMADZU UVM-1240 UV-Visible spectrophotometer.

### Synthesis of substituted thiosemicarbazides (**1**)

To a solution of hydrazine monohydrate (5 mmol) in ethanol (10 mL), a suspension of an isothiocyanate (5 mmol) in ethanol (10 mL) was added dropwise with vigorous stirring and cooling in an ice bath. The mixture was allowed to stand overnight. The solid product so formed was filtered, dried, and crystallized from ethanol to give product.

**Synthesis of 5-substituted isatins-thiosemicarbazones (3a-d)**

Thiosemicarbazides (**1**) (0.8 mmol), 5-substituted isatin derivatives (**2**) (0.8 mmol) and one drop of HCl were added to aqueous EtOH (20 mL) and the mixture was refluxed at 78 $^0$C for 3h. The obtained precipitate was filtered and washed with EtOH to afford pure desired products or recrystallized from ethanol. Then the formed colour solid was isolated and dried in air. The products were obtained good yields (80–90%) as shown in Scheme 1.




**Scheme 2.** Synthesis of the 5-substituted isatins-thiosemicarbazones (**3a–3d**).

**RESULTS and DISCUSSION**

All the synthesized compounds were new. The current experimental results for the physical data, melting points, yields, and elemental analyses are summarized in Tables 1 and 2.

**Table 1**. Physical data of the synthesized compounds (**3a–d**)

| Compounds | X | Melting Point (ºC) | Yields (%) | Colour |
|---|---|---|---|---|
| **3a** | -H | 213-214 | 89 | Yellow |
| **3b** | -Cl | 215-216 | 80 | Yellow |
| **3c** | -F | 220-221 | 87 | Dark Yellow |
| **3d** | -$OCH_3$ | 204-207 | 90 | Dark Red |

**Table 2.** The results of elemental analysis for the compounds

| Compounds | Molecular formula | Moleculer Weight, g/mol | Calculated | | | Experimental | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | C% | H% | N% | C% | H% | N% |
| **3a** | $C_{17}H_{14}N_4O_3S$ | 354.08 | 57.62 | 3.98 | 15.81 | 57.69 | 4.09 | 15.71 |
| **3b** | $C_{17}H_{13}ClN_4O_3S$ | 388.04 | 52.51 | 3.37 | 14.41 | 51.96 | 3.30 | 14.40 |
| **3c** | $C_{17}H_{13}FN_4O_3S$ | 372.07 | 54.83 | 3.52 | 15.05 | 54.68 | 3.42 | 15.19 |
| **3d** | $C_{18}H_{16}N_4O_4S$ | 384.09 | 56.24 | 4.20 | 14.58 | 56.43 | 4.29 | 14.35 |

**Vibrational frequencies**

In the FT-IR spectrum of the synthesized compounds, the asymmetric and symmetric stretching bands of the amino group (–$NH_2$) did not observed at 3600–3200 $cm^{-1}$. This result indicated a successful reaction as expected.

In compound **3d**, while the –NH (isatin) stretching vibration was observed at 3386 $cm^{-1}$; the -NH stretching vibrations of thiosemicarbazone were observed at 3216 and 3175 $cm^{-1}$. The C=O signal of isatin ring was observed at 1689 $cm^{-1}$, the –C=N stretching vibration was observed at 1584 $cm^{-1}$; the C=S signal of isatin ring was observed at 1462 $cm^{-1}$, the –C-N stretching vibration was appeared at 1141 $cm^{-1}$, and the -C-O signals of the phenyl ring were observed at 1033 $cm^{-1}$, as shown in Figure 1. The IR peaks of the compounds are given in Table 3. These frequency values of all the synthesized compounds were in close agreement with those reported for the similar compounds (Tarasconi et al., 2000; Ebrahimi et al., 2015; Almutairi et al., 2018).

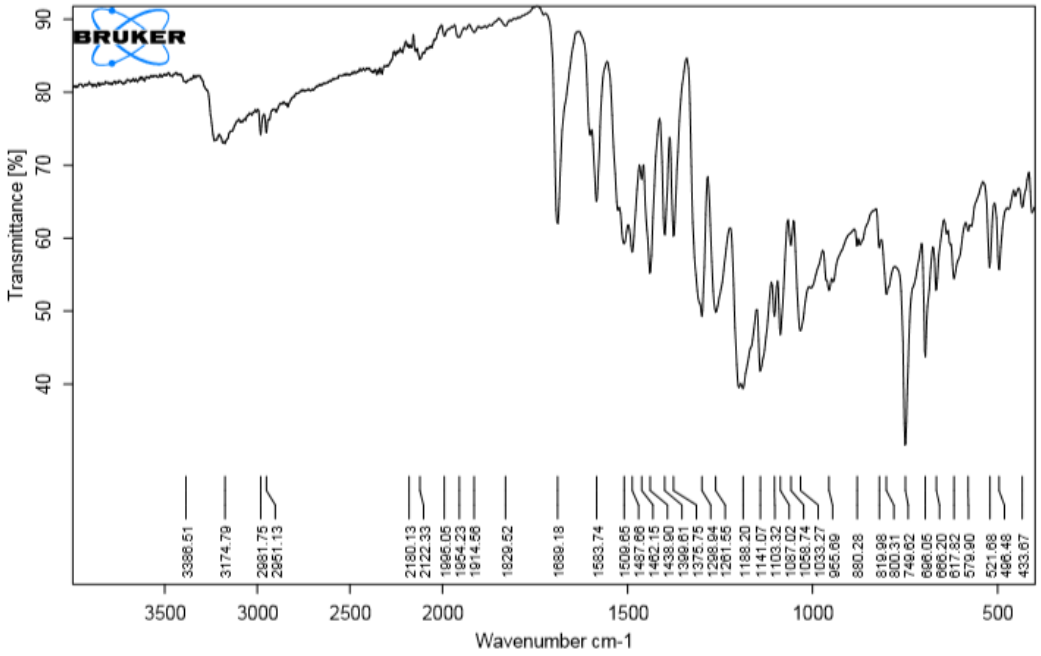



**Figure 3.** FT-IR spectrum of compound **3d**

**Table 3.** FT-IR values of the compounds ($cm^{-1}$)

| Comp. | -NH (ist) | -NH (tsch) | -NH-Ar (tsch) | Ar CH | C=O | C=N | C=S | C-N | C-O | Spec. Vib. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **3a** | 3394 | 3236 | 3192 | 3073 | 1736 | 1597 | 1475 | 1141 | 1036 | - |
| **3b** | 3354 | 3198 | 3152 | 3048 | 1685 | 1585 | 1464 | 1143 | 1035 | C-Cl: 748 |
| **3c** | 3389 | 3210 | 3188 | 3063 | 1683 | 1587 | 1463 | 1144 | 1031 | C-F: 883 |
| **3d** | 3386 | 3216 | 3175 | 3055 | 1689 | 1584 | 1462 | 1141 | 1033 | - |

**tsch:** thiosemicarbohydrazide, **ist:** isatin

## $^1$H NMR spectral interpretations

The $^1$H NMR spectra of the synthesized compounds were detected in DMSO-$d_6$ as solvent. For compound **3d**, while the –NH peak of isatin was observed as a singlet at 13.08 ppm, the –NH signals of thiosemicarbazone were detected as singlets at 10.81 and 10.75 ppm. The proton signals (H2-H3-H4) of isatin ring were observed between 7.37 and 6.78 ppm (Fig. 2). The H4 proton was observed as doublet peak at 7.09-7.08 ($J$ = 2.1Hz) ppm. The H2 proton coupled to the H3 and H4 proton was showed doublet of doublets peaks at 6.81-6.78 ($J$ = 7.3, 2.2 Hz) ppm. The H3 proton coupled to the H2 proton and was detected doublet peaks at 7.37-7.35 ($J$ = 7.2 Hz) ppm. The aromatic protons (H6-H9) of aryl ring were observed at 7.94-6.89 ppm. The methoxy (–$OCH_3$) proton signal of isatin and ester region was observed as a singlet in the range of 3.63 and 3.70 ppm, respectively. DMSO-$d_6$ and water in DMSO (HOD, $H_2O$) signals were shown around at 2.00, 2.50 (quintet), and 3.30 (variable, based on the solvent and its concentration) ppm, respectively (Williams and Fleming, 1996). These results are consistent with the values of formerly reported for similar compounds (Tarasconi et al., 2000; Ebrahimi et al., 2015; Almutairi et al., 2018). Proton chemical shift values of the compounds are presented in Table 4.

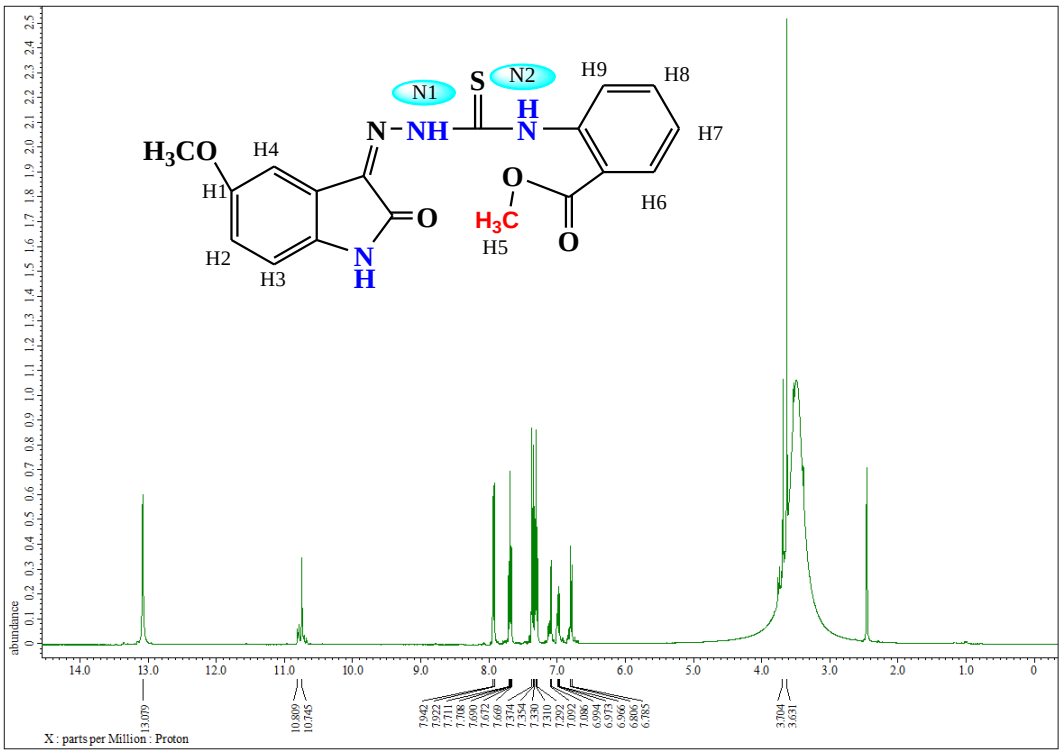



**Figure 2.** $^1$H NMR spectrum of compound **3d**

**Table 4.** $^1$H NMR (δ, ppm, in DMSO-$d_6$) values related to synthesized compounds

| Comp. | –N$^2$H-N | =N–N$^1$H | Ar H6-H9 | ist NH | ist H1 | ist H2 | ist H3 | ist H4 | $OCH_3$ ester |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **3a** | 11.08 | 10.95 | 7.96-6.95 | 13.10 | 7.45-7.43 | 7.34-7.32 | 7.58-7.56 | 7.49-7.47 | 3.65 |
| **3b** | 11.08 | 10.98 | 7.96-6.89 | 13.22 | - | 6.90-6.87 | 7.77-7.75 | 7.43-7.41 | 3.52 |
| **3c** | 11.15 | 11.03 | 7.96-6.97 | 13.17 | - | 6.84-6.81 | 7.74-7.72 | 7.35-.7.32 | 3.55 |
| **3d** | 10.81 | 10.75 | 7.94-6.89 | 13.08 | 3.63 | 6.81-6.78 | 7.37-7.35 | 7.09-7.08 | 3.70 |

## $^{13}$C NMR spectral interpretations

The $^{13}$C NMR spectra of all compounds were obtained in DMSO-$d_6$. The $^{13}$C NMR spectrum of the compound **3d** showed 18 different resonances in good agreement with the proposed structure as shown in Figure 3. In compound **3d**, the -C=S (C10) signal of the carbohydrazide region was detected at 169.8 ppm. The characteristic -C=N (C9) and -C=O (C8) peaks of the isatin ring were observed at 146.2 and 164.0 ppm, respectively. The carbons (C2-C7) of the isatin ring were observed at 155.4, 112.3, 119.9, 138.7, 115.2, and 109.3 ppm, respectively. The C2 carbons atom shifted down-field (high values of δ) due to the presence of methoxy group. The aromatic carbons (C13-C18) of aryl ring were observed at between 139.3 and 114.9 ppm. The methoxy (-$OCH_3$) peaks of isatin and ester region were detected at 56.3 and 56.0 ppm, respectively. The -C=O (C12) peak of ester region was observed as a singlet in the range of 155.9 ppm. Additionally, the C atoms (for C2-C7) were also split into doublets due to interacting with the atomic nucleus of F for compound **3c**. These data are consistent with the values reported earlier for similar compounds (Tarasconi et al., 2000; Ebrahimi et al., 2015; Almutairi et al., 2018). The carbon chemical shift values of the synthesized compounds are given in Table 5.

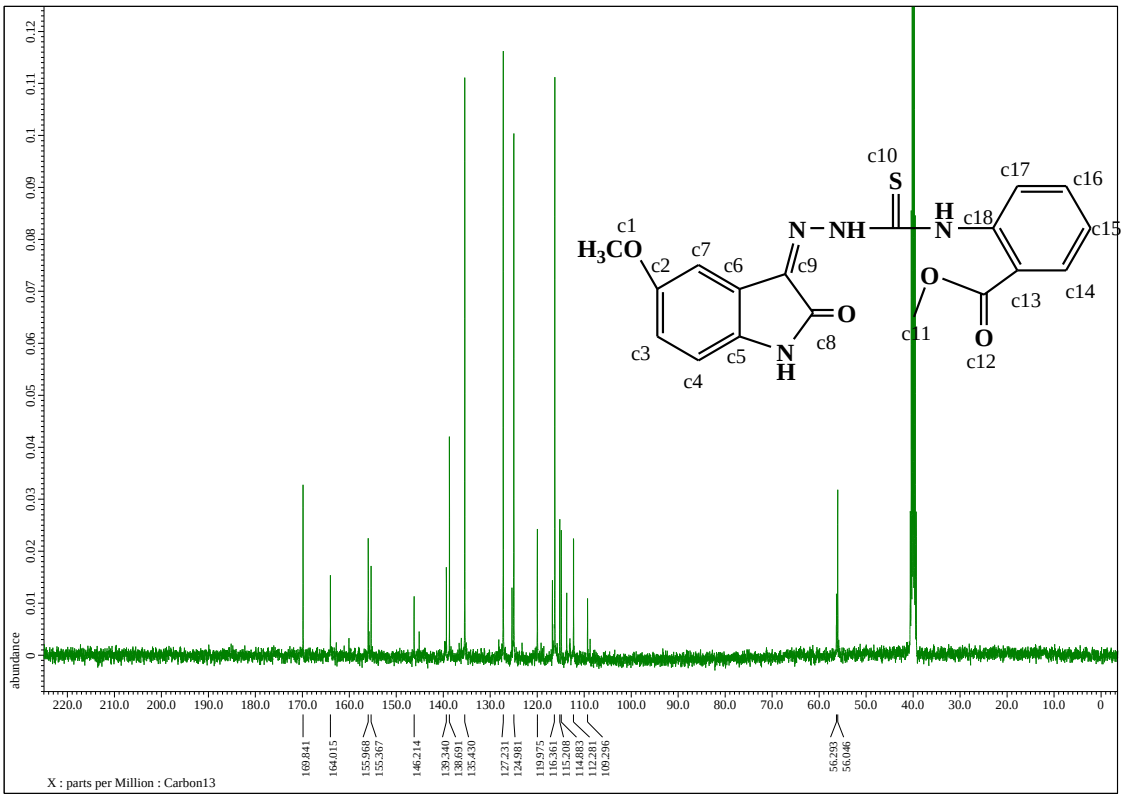



**Figure 3.** $^{13}$C NMR spectrum of compound **3d**

**Table 5.** $^{13}$C NMR data of synthesized compounds (DMSO-$d_6$, δ/ppm).

| Comp. | C1 ($OCH_3$) | C2 (C-X) | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 (C=O) isatin | C9 (C=N) | C10 (C=S) | C11 ($OCH_3$) | C12 (C=O) ester | C13-C18 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **3a** | - | 125.1 | 112.7 | 115.8 | 142.5 | 114.2 | 107.3 | 159.5 | 146.6 | 164.0 | 54.0 | 156.9 | 135.7-115.6 |
| **3b** | - | 155.4 | 115.6 | 120.1 | 139.7 | 116.3 | 113.8 | 161.5 | 144.6 | 170.4 | 51.3 | 157.5 | 135.5-115.2 |
| **3c** | - | 155.7<br>154.9 | 136.6<br>136.2 | 125.3<br>125.0 | 139.9<br>139.5 | 123.7<br>123.6 | 116.7<br>116.4 | 163.8 | 145.9 | 170.5 | 54.6 | 157.9 | 135.3-111.9 |
| **3d** | 56.3 | 155.4 | 112.3 | 119.9 | 138.7 | 115.2 | 109.3 | 164.0 | 146.2 | 169.8 | 56.0 | 155.9 | 139.3-114.9 |

## CONCLUSION

In this study, novel 5-substituted isatins-thiosemicarbazones were synthesized from the reaction of isatin derivatives and aryl isothiocyanate in the presence of ethanol at reflux. The products were prepared in good yields with 80–90%. The synthesized compounds were elucidated by using IR, $^1$H NMR, and $^{13}$C NMR spectroscopic methods and elemental analysis.

## REFERENCES

Aboul-Fadl T, Bin-Jubair FA. 2010. Anti-tubercular activity of isatin derivatives. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences 1:113-126.

Ali AQ, Teoh SG, Eltayeb NE, Khadeer Ahamed MB, Abdul Majid A, Almutaleb AA. 2017. Synthesis, structure and in vitro anticancer, DNA binding and cleavage activity of palladium (II) complexes based on isatin thiosemicarbazone derivatives. Applied Organometallic Chemistry 31:e3813.

Almutairi MS, Zakaria AS, Ignasius PP, Al-Wabli RI, Joe IH, Attia MI. 2018. Synthesis, spectroscopic investigations, DFT studies, molecular docking and antimicrobial potential of certain new indole-isatin molecular hybrids: Experimental and theoretical approaches. Journal of Molecular Structure 1153:333-345.

Bal TR, Anand B, Yogeeswari P, Sriram D. 2005. Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin β-thiosemicarbazone derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 15:4451-4455.

Banerjee D, Yogeeswari P, Bhat P, Thomas A, Srividya M, Sriram D. 2011. Novel isatinyl thiosemicarbazones derivatives as potential molecule to combat HIV-TB co-infection. European Journal of Medicinal Chemistry 46:106-121.

Bingul M, Şenkuytu E, Saglam MF, Boga M, Kandemir H, Sengul IF. 2019. Synthesis, photophysical and antioxidant properties of carbazole-based bis-thiosemicarbazones. Research on Chemical Intermediates 45:4487–4499.

Chohan ZH, Pervez H, Rauf A, Khan KM, Supuran CT. 2004. Isatin-derived antibacterial and antifungal compounds and their transition metal complexes. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 19:417-423.

Ebrahimi HP, Hadi JS, Alsalim TA, Ghali TS, Bolandnazar Z. 2015. A novel series of thiosemicarbazone drugs: from synthesis to structure. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 137:1067-1077.

El-Faham A, Hozzein WN, Wadaan MA, Khattab SN, Ghabbour HA, Fun H-K, Siddiqui MR. 2015. Microwave synthesis, characterization, and antimicrobial activity of some novel isatin derivatives. Journal of Chemistry 2015.

Hall IH, Chen S, Rajendran K, West D. 1996. The Anti-inflammatory Activiy of Metal Complexes of Heterocyclic Thiosemicarbazones, 2-Substituted Pyridine N-Oxides and 2-Pyridylthioureas. Applied Organometallic Chemistry 10:485-493.

Haribabu J, Subhashree G, Saranya S, Gomathi K, Karvembu R, Gayathri D. 2016. Isatin based thiosemicarbazone derivatives as potential bioactive agents: Anti-oxidant and molecular docking studies. Journal of Molecular Structure 1110:185-195.

Hu W-x, Zhou W, Xia C-n, Wen X. 2006. Synthesis and anticancer activity of thiosemicarbazones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16:2213-2218.

Kumar GK, Chavarria GE, Charlton-Sevcik AK, Arispe WM, MacDonough MT, Strecker TE, Chen S-E, Siim BG, Chaplin DJ, Trawick ML. 2010. Design, synthesis, and biological evaluation of potent thiosemicarbazone based cathepsin L inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20:1415-1419.

Liu M-C, Lin T-S, Cory JG, Cory AH, Sartorelli AC. 1996. Synthesis and biological activity of 3-and 5-amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. Journal of Medicinal Chemistry 39:2586-2593.

Pervez H, Iqbal MS, Tahir MY, Nasim F-u-H, Choudhary MI, Khan KM. 2008. In vitro cytotoxic, antibacterial, antifungal and urease inhibitory activities of some N 4-substituted isatin-3-thiosemicarbazones. Journal of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry 23:848-854.

Tarasconi P, Capacchi S, Pelosi G, Cornia M, Albertini R, Bonati A, Dall'Aglio PP, Lunghi P, Pinelli S. 2000. Synthesis, spectroscopic characterization and biological properties of new natural aldehydes thiosemicarbazones. Bioorganic & Medicinal Chemistry 8:157-162.

Williams D, Fleming I. 1996. RNA structure and NMR spectroscopy. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. In: McGraw-Hill, New York.

# Synthesis and spectroscopic studies of novel Schiff bases from carbohydrazide

Hasan Yakan

University of Ondokuz Mayis, Faculty of Education, Department of Science and Mathematics Education, Samsun, Turkey.

Corresponding Author. E-mail: hasany@omu.edu.tr

**Abstract**

New Schiff bases were prepared from carbohydrazide and various aldehydes in the presence of three drops acetic acid under reflux in ethanol for 3h. The structures of these synthesized compounds were determined using IR, $^{1}$H NMR, $^{13}$C NMR spectroscopy and elemental analysis.

**Keywords:** Schiff bases, aldehydes, carbohydrazide, spectroscopic methods.

## INTRODUCTION

Schiff bases are occurred when any amines reacts with an aldehyde or a ketone. They are a significant class in chemistry. They have several biological activities and applications in medicinal chemistry (Shi et al., 2007; Da Silva et al., 2011; Shukla et al., 2013). They have been reported as antioxidant (Sharma et al., 2013), antifungal (Karthikeyan et al., 2006), antibacterial (Chigurupati, 2015) and anticancer (Shukla et al., 2013).
Carbohydrazones exhibited an extensive broad of medicinal properties and biological activities (Kurzer and Wilkinson, 1970; Bustos et al., 1990; Bacchi et al., 1999; Moubaraki et al., 1999). They show different application such as tumor, tuberculosis, leishmania, in pharmaceutical chemistry (Richardson and Bernhardt, 1999; Khan et al., 2008). They have also been reported to exhibit analgesic, anticonvulsant, antimicrobial, and antiinflammatory properties (Küçükgüzel et al., 2002; Rollas et al., 2002).
In this work, a new series of Schiff bases were obtained from carbohydrazide and different aldehydes in the presence of three drops acetic acid under reflux in ethanol for 3h. The chemical structure of the products was confirmed by using IR, $^{1}$H, and $^{13}$C NMR spectroscopy and by elemental analysis.

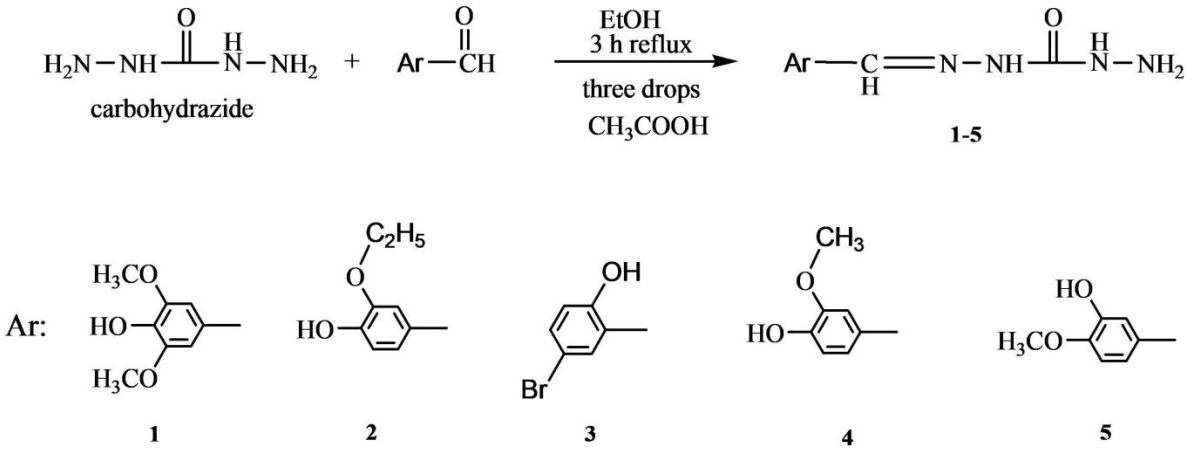
## MATERIALS AND METHODS

### Measurement and reagents

All starting materials and solvent were purchased from Aldrich, Sigma, or Merck Chemical Company and were used without further purification. The solvent was spectroscopic grade. The elemental analysis was performed on a Eurovector EA3000. Infrared spectra were recorded on a Bruker Alpha FT-IR spectrometer. $^{1}$H NMR and $^{13}$C NMR spectra were taken on a Bruker Avance DPX-400 (400 MHz) in DMSO-$d_6$ spectrophotometer. The splitting patterns are indicated as s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), t (triplet), q (quartet), and m (multiplied). Melting points were measured using a Gallenkamp melting point apparatus and were uncorrected.

### Synthesis of novel Schiff bases from carbohydrazide (1-5)

Carbohydrazide (5 mmol), various aldehydes (5 mmol) and three drops of acetic acid were added to aqueous EtOH (20 mL) and the mixture was refluxed at 78 $^{0}$C for 3h. The obtained precipitate was filtered and washed with EtOH to afford pure desired products or recrystallized from ethanol. Then the formed colour solid was isolated and dried in air. The products were obtained good yields (71–88%) as shown in Scheme 1.




**Scheme 4.** Synthesis of the novel Schiff bases from carbohydrazide (**1-5**).

## RESULTS and DISCUSSION

All the synthesized compounds were new. The results of the physical data, melting points, yields, and elemental analyses of synthesized compounds are summarized in Tables 1 and 2.

**Table 1.** Physical data of the synthesized compounds

| Compounds | Melting Point (ºC) | Yields (%) | Colour |
|---|---|---|---|
| **1** | 187-189 | 76 | White |
| **2** | 180-183 | 83 | White |
| **3** | 311-312 | 88 | White |
| **4** | 225-227 | 75 | White |
| **5** | 192-193 | 71 | White |

**Table 2.** The results of elemental analysis of the compounds

| Compounds | Molecular formula | Molecular Weight, g/mol | Calculated | | | Experimental | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | C% | H% | N% | C% | H% | N% |
| **1** | $C_{10}H_{14}N_4O_4$ | 254.10 | 47.24 | 5.55 | 22.04 | 47.44 | 5.49 | 22.14 |
| **2** | $C_{10}H_{14}N_4O_3$ | 238.11 | 50.41 | 5.92 | 23.52 | 50.65 | 5.87 | 23.46 |
| **3** | $C_8H_9BrN_4O_2$ | 271.99 | 35.19 | 3.32 | 20.52 | 35.28 | 3.28 | 20.45 |
| **4** | $C_9H_{12}N_4O_3$ | 224.09 | 48.21 | 5.39 | 24.99 | 48.01 | 5.31 | 24.88 |
| **5** | $C_9H_{12}N_4O_3$ | 224.09 | 48.21 | 5.39 | 24.99 | 48.13 | 5.38 | 24.92 |

### Vibrational frequencies

In the FT-IR spectrum of the synthesized compounds, the aldehyde group (–CHO two bands) signal of the starting material was not observed near 2750-2650 $cm^{-1}$. This result indicated a successful reaction as expected. In compound **4**, the asymmetric and symmetric stretching bands of the amino group ($–NH_2$) were observed at 3328-3302 $cm^{-1}$. The –OH group stretching vibrations was observed at 3513 $cm^{-1}$; the –NH stretching vibration was observed at 3182 $cm^{-1}$; the –C=O signal of carbohydrazide ring was observed at 1668 $cm^{-1}$, the –C=N stretching vibration was observed at 1588 $cm^{-1}$; the -C–N stretching vibration was appeared at 1241 $cm^{-1}$, and the -C–O signals of the aryl ring were observed at 1110 $cm^{-1}$, as shown in Figure 1. The IR peaks of the compounds are given in Table 3. These frequency values of all the synthesized compounds were in close

agreement with those reported for the similar compounds (Bustos et al., 1990; Sinha et al., 2008; Cinarli et al., 2011; Božić et al., 2017).

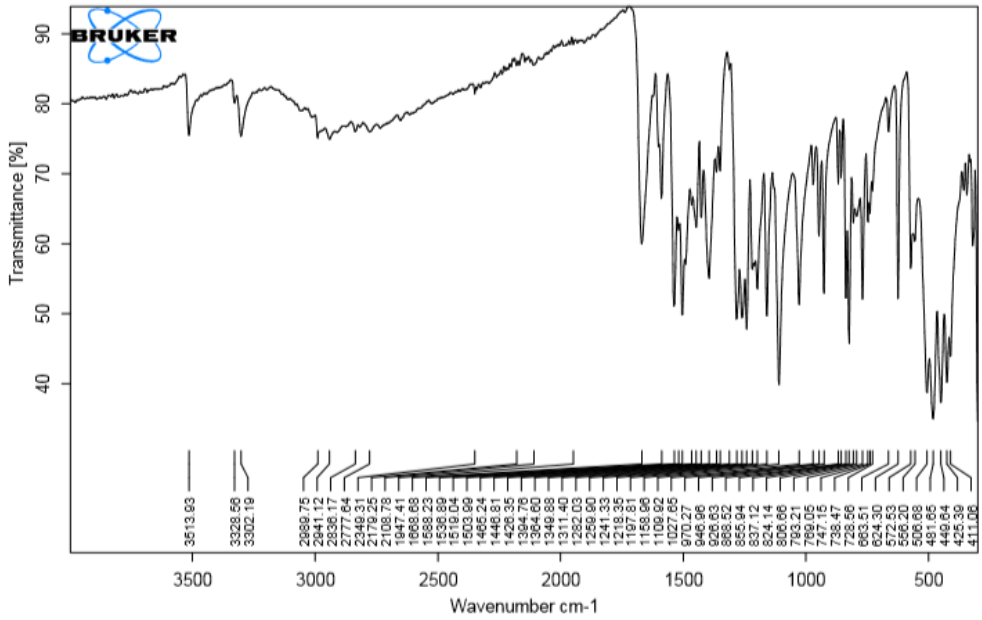



**Figure 5.** FT-IR spectrum of compound **4**

**Table 3.** FT-IR values of the compounds ($cm^{-1}$)

| Comp. | OH | -$NH_2$ | -NH | Ar CH | C=O | C=N | C-N | C-O | Spec. Vib. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 3432 | 3306-3206 | 3186 | 3070 | 1663 | 1588 | 1216 | 1107 | - |
| **2** | 3530 | 3332-3294 | 3178 | 3104 | 1674 | 1586 | 1245 | 1117 | - |
| **3** | 3462 | 3395-3342 | 3195 | 3108 | 1664 | 1590 | 1202 | 1118 | C-Br: 682 |
| **4** | 3513 | 3328-3302 | 3182 | 3025 | 1668 | 1588 | 1241 | 1110 | - |
| **5** | 3345 | 3338-3219 | 3185 | 3097 | 1665 | 1579 | 1234 | 1117 | - |

### $^1$H NMR spectral interpretations

The $^1$H NMR spectra of the synthesized compounds were detected in DMSO-$d_6$ as solvent. For compound **4**, the the carbohydrazide amino group (H1, -$NH_2$) were observed at 4.37 ppm. The –NH (H2 and H3) peaks of carbohydrazone were detected as singlets at 10.46 and 9.41 ppm. The signal of imin (–CH=N) was observed as a singlet at 8.05 ppm (Fig. 2). The proton signals (H5-H6-H7) of aryl ring were observed between 7.37 and 6.78 ppm. The H5 proton was observed as singlet peak at 7.36 ppm. The H6 proton coupled to the H7 proton and was detected doublet peaks at 6.83-6.81 ppm. The H7 proton coupled to the H6 proton and was detected doublet peaks at 7.09-7.07 ppm. The methoxy (–$OCH_3$) proton signal was observed as a singlet in the range of 3.85 ppm. The signal of the OH proton appeared as a singlet at 9.39 ppm. DMSO-$d_6$ and water in DMSO (HOD, $H_2O$) signals were shown around at 2.00, 2.50 (quintet), and 3.30 (variable, based on the solvent and its concentration) ppm, respectively (Williams and Fleming, 1996). These results are consistent with the values of formerly reported for similar compounds. Proton chemical shift values of the compounds are presented in Table 4 (Bustos et al., 1990; Sinha et al., 2008; Cinarli et al., 2011; Božić et al., 2017).

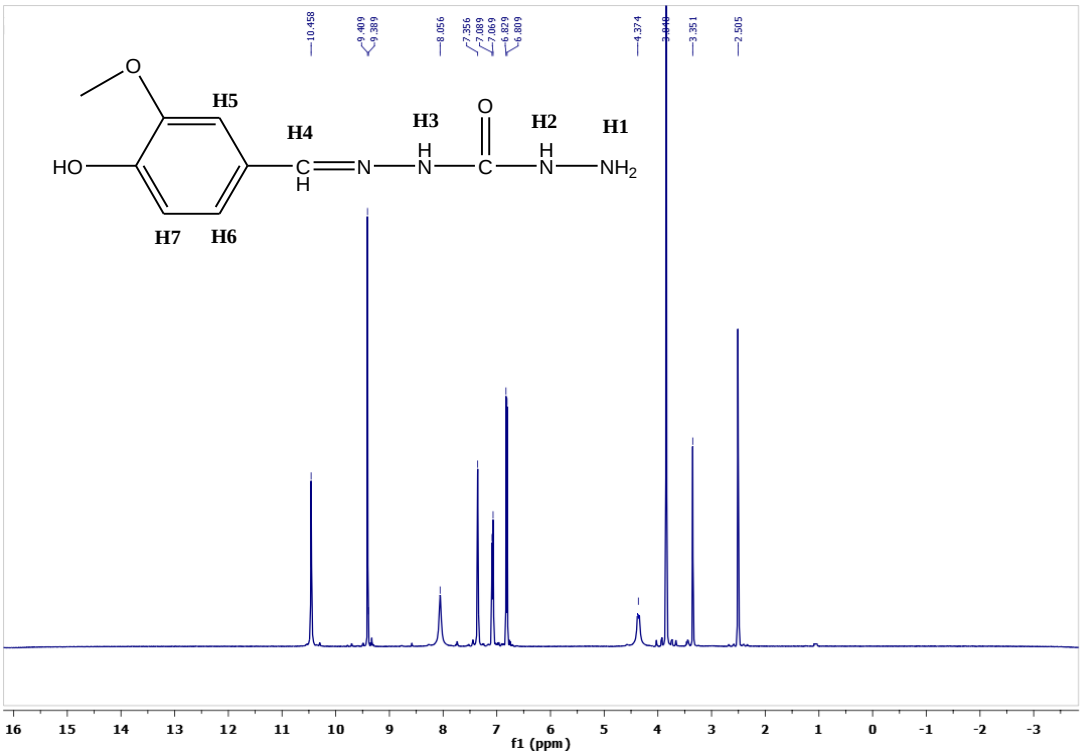



**Figure 2.** $^{1}$H NMR spectrum of compound **4**

**Table 4.** $^{1}$H NMR (δ, ppm, in DMSO-$d_6$) values related to synthesized compounds

| Comp. | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | Ar H | OH | $CH_2$-$OCH_3$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 4.25 s | 10.37 s | 9.55 s | 7.88 s | 7.46 s | 7.06 s | - | - | 8.14 s | 3.71 s |
| **2** | 4.28 s | 10.48 s | 9.69 s | 7.95 s | 7.16 s | 6.93-6.91 d | 7.17-7.15 d | - | 8.53 s | 3.54 s<br>2.03 s |
| **3** | 4.33 s | 10.33 s | 9.35 s | 7.83 s | - | 6.72 s | - | 6.65-6.83 d<br>7.06-7.08 d | 8.45 s | - |
| **4** | 4.37 s | 10.46 s | 9.41 s | 8.05 s | 7.36 s | 6.83-6.81 d | 7.09-7.07 d | - | 9.39 s | 3.85 s |
| **5** | 4.22 s | 10.42 s | 10.20 s | 7.72 s | 7.27- 7.21 d | 6.97-6.90 dd | 7.06-7.04 d | - | 9.02 s | 3.81 s |

## $^{13}$C NMR spectral interpretations

The $^{13}$C NMR spectra of all compounds were obtained in DMSO-$d_6$. The $^{13}$C NMR spectrum of the compound **4** showed 9 different resonances in good consistent with the targeted structure as shown in Figure 3. In compound **4**, the -C=O (C1) signal of the carbohydrazone region was detected at 152.7 ppm. The characteristic -C=N (C2) peak were observed at 143.9. The carbons (C3-C8) of the aryl ring were observed at 126.6, 109.8, 121.8, 148.8, 115.9, and 148.4. ppm, respectively. The C6 and C8 carbons atom shifted down-field (high values of δ) due to the presence of methoxy and hydroxy groups. The methoxy (-$OCH_3$) peaks of isatin and ester region were detected at 56.3. These data are consistent with the values reported earlier for similar

compounds. The carbon chemical shift values of the synthesized compounds are given in Table 5 (Bustos et al., 1990; Sinha et al., 2008; Cinarli et al., 2011; Božić et al., 2017).

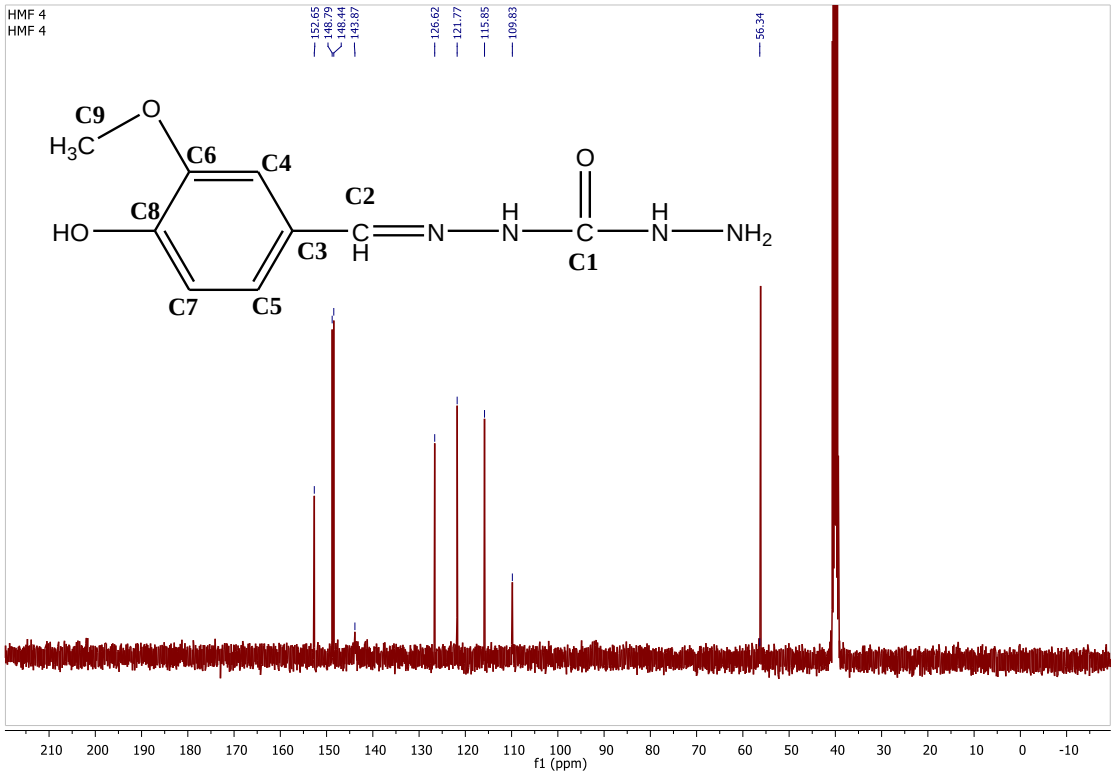



**Figure 3.** $^{13}$C NMR spectrum of compound **4**

**Table 5.** $^{13}$C NMR data of synthesized compounds (DMSO-$d_6$, δ/ppm).

| Comp. | C1, C=O | C2, CH=N | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9, $CH_3$, $CH_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 158.2 | 142.6 | 127.5 | 107.8 | 120.4 | 150.2 | 150.2 | 147.8 | 56.5 |
| **2** | 157.2 | 142.8 | 127.1 | 108.3 | 120.8 | 147.6 | 118.7 | 148.6 | 27.2 |
| | | | | | | | | | 48.8 |
| **3** | 155.5 | 143.1 | 128.2 | 147.7 | 122.4 | 126.7 | 132.4 | 116.7 | - |
| **4** | 152.7 | 143.9 | 126.6 | 109.8 | 121.8 | 148.8 | 115.9 | 148.4 | 56.3 |
| **5** | 157.6 | 141.1 | 128.1 | 113.3 | 119.5 | 147.0 | 112.4 | 56.2 | 149.4 |

## CONCLUSION

Schiff bases have been synthesized by condensation of carbohydrazide with various aldehydes derivatives in the presence of three drops acetic acid under reflux in ethanol. The resulting some imine derivatives were prepared in excellent yields 71–88%. They were elucidated by using IR, $^1$H NMR, and $^{13}$C NMR spectroscopies and elemental analysis.

**REFERENCES**

Bacchi A, Carcelli M, Pelagatti P, Pelizzi C, Pelizzi G, Zani F. 1999. Antimicrobial and mutagenic activity of some carbono-and thiocarbonohydrazone ligands and their copper (II), iron (II) and zinc (II) complexes. Journal of Inorganic Biochemistry 75:123-133.

Božić A, Filipović N, Novakovic I, Bjelogrlić S, Nikolić J, Drmanić S, Marinković A. 2017. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of carbohydrazones. Journal of the Serbian Chemical Society 82:495-508.

Bustos C, Burckhardt O, Schrebler R, Carrillo D, Arif A, Cowley A, Nunn C. 1990. Synthesis, characterization, and electrochemistry of cis-dioxomolybdenum (VI) complexes of Schiff bases derived from carbohydrazide, thiocarbohydrazide, and salicylaldehyde. Crystal structures of [$MoO_2$(*o*-$OC_6H_4CH$:NN: CSNHN:$CHC_6H_4OH$-*o*)$Me_2SO$] and [($MoO_2$)$_2$(*o*-$OC_6H_4CH$:NN:CONN:$CHC_6H_4O$-o)($Me_2SO$)$_2$]. cntdot. 0.5 $Me_2SO$. Inorganic Chemistry 29:3996-4001.

Chigurupati S. 2015. Designing new vanillin schiff bases and their antibacterial Studies. Journal of Medical and Bioengineering 2015; 4: 363 366.

Cinarli A, Gürbüz D, Tavman A, Birteksöz AS. 2011. Synthesis, spectral characterizations and antimicrobial activity of some Schiff bases of 4-chloro-2-aminophenol. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia 25.

Da Silva CM, da Silva DL, Modolo LV, Alves RB, de Resende MA, Martins CV, de Fátima Â. 2011. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. Journal of Advanced research 2:1-8.

Karthikeyan MS, Prasad DJ, Poojary B, Bhat KS, Holla BS, Kumari NS. 2006. Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14:7482-7489.

Khan KM, Mughal UR, Perveen S, Choudhary MI. 2008. Schiff bases of istain: potential anti-leishmanial agents. Letters in Drug Design & Discovery 5:243-249.

Kurzer F, Wilkinson M. 1970. Chemistry of carbohydrazide and thiocarbohydrazide. Chemical reviews 70:111-149.

Küçükgüzel ŞG, Oruç EE, Rollas S, Şahin F, Özbek A. 2002. Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. European Journal of Medicinal Chemistry 37:197-206.

Moubaraki B, Murray KS, Ranford JD, Vittal JJ, Wang X, Xu Y. 1999. Preparation, characterisation and structures of copper (II) complexes of an asymmetric anti-cancer drug analogue. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions:3573-3578.

Richardson DR, Bernhardt PV. 1999. Crystal and molecular structure of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone (NIH) and its iron (III) complex: an iron chelator with anti-tumour activity. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry 4:266-273.

Rollas S, Gulerman N, Erdeniz H. 2002. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines. Il Farmaco 57:171-174.

Sharma UK, Sood S, Sharma N, Rahi P, Kumar R, Sinha AK, Gulati A. 2013. Synthesis and SAR investigation of natural phenylpropene-derived methoxylated cinnamaldehydes and their novel Schiff bases as potent antimicrobial and antioxidant agents. Medicinal Chemistry Research 22:5129-5140.

Shi L, Ge H-M, Tan SH, Li HQ, Song YC, Zhu HL, Tan RX. 2007. Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. European Journal of Medicinal Chemistry 42:558-564.

Shukla S, Srivastava R, Shrivastava S, Sodhi A, Kumar P. 2013. Synthesis, characterization, in vitro anticancer activity, and docking of Schiff bases of 4-amino-1, 2-naphthoquinone. Medicinal Chemistry Research 22:1604-1617.

Sinha D, Tiwari AK, Singh S, Shukla G, Mishra P, Chandra H, Mishra AK. 2008. Synthesis, characterization and biological activity of Schiff base analogues of indole-3-carboxaldehyde. European Journal of Medicinal Chemistry 43:160-165.

Williams D, Fleming I. 1996. *RNA structure and NMR spectroscopy. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. In: McGraw-Hill, New York.

# Endokrin Bozucu Kimyasalların Obezojenik Etkileri

Mümine Beler[1*], Derya Cansız[2], Esra Dandin[1], Ünsal Veli Üstündağ[3], İsmail Ünal[1], Ebru Emekli-Alturfan[1]

[*1] Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri ABD, İstanbul, Türkiye
[2] İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Biyokimya ABD, İstanbul, Türkiye
[3]Istanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, İstanbul, Türkiye

dytminebeler@gmail.com

## Özet

Obezite, Dünya Sağlık Örgütü tarafından vücutta sağlığı tehdit edecek ölçüde anormal veya aşırı yağ birikmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Obezitenin neden olduğu bazı hastalıklar arasında insülin direnci, tip 2 diyabet (T2DM), kardiyovasküler hastalık, infertilite, osteoartirit ve bazı kanser türleri bulunmaktadır. Obezojen olarak tanımladığımız maddeler çeşitli mekanizmalarla vücut lipit metabolizmasını düzenleyen olaylara etki ederek obezitenin gelişmesine neden olabilmekte ve bu mekanizmalarda genetik veya epigenetik faktörlerin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Endokrin bozucular, vücudun normal işleyişini hormonları taklit ederek ya da engelleyerek bozan doğal ya da sentetik kimyasal maddelerdir. Çevresel endokrin bozucu maddeler obezojen maddelerin içerisinde en çok dikkat çekici olanlarıdır. Endojen peptid ya da steroid hormonların metabolizmalarını arttırarak ya da engelleyerek, hipotalamus, adipoz doku, karaciğer ve diğer doku/organlardaki nükleer reseptörleri aktive veya antagonize ederek etki gösterirler. Bisfenol A (BFA) fenol yapısında olan, plastiklerin sertleşmesini sağlamak amacıyla plastik materyale eklenen; yemek kapları, bebek biberonları, yapıştırıcılar, boya tozları ve diş hekimliğinde dolgu maddesi olarak kullanılan ve çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışmada da gösterildiği üzere östrojenik etkili bir endokrin bozucu kimyasal maddedir. Bununla birlikte BFA'nın insülin direnci ve vücut yağ oluşumuna sebep olduğu çalışmalarda ortaya konulmuştur. Tüm bu bilgilerin ışığında çalışmamızda zebra balıklarında BFA'nın böbrek dokusundaki oksidan-antioksidan sistem üzerine olan etkileri ile incelenmiştir. Çalışmamızın sonuçları BFA'nın hem düşük hem de yüksek dozda zebra balıklarında oksidan-antioksidan dengeyi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir.
**Anahtar Kelimeler**: Endokrin bozucu kimyasal, Bisfenol A, Obezojen, Zebra balığı

# Obesogenic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals

## Abstract

Obesity is defined by the World Health Organization as abnormal or excessive fat accumulation in the body to the extent of threatening health. Some diseases caused by obesity include insulin resistance, type 2 diabetes (T2DM), cardiovascular disease, infertility, osteoarthritis and some types of cancer. The substances we define as obesogen can cause the development of obesity by influencing the events that regulate body lipid metabolism through various mechanisms, and it is thought that genetic or epigenetic factors may be effective in these mechanisms. Endocrine disruptors are natural or synthetic chemicals that disrupt the normal functioning of the body by imitating or blocking hormones. Environmental endocrine disruptors are the most remarkable among obesogenic substances. They act by increasing or inhibiting the metabolism of endogenous peptide or steroid hormones, by activating or antagonizing nuclear receptors in the hypothalamus, adipose tissue, liver and other tissues / organs. Bisphenol A (BPA) phenol structure, added to the plastic material in order to make the plastics harden; It is an estrogenically effective endocrine disrupting chemical substance used as food containers, baby bottles, adhesives, dye powders and dentistry as shown in many in vitro and in vivo studies. However, it has been revealed in studies that BPA causes insulin resistance and body fat formation. In the light of all this information, in our study, the effects of BPA on the oxidant-antioxidant system in kidney tissue in zebra fish were examined. The results of our study have been shown that BFA negatively affects the oxidant-antioxidant balance in both low and high doses of zebra fish.

**Keywords:** Endocrine Disrupting Chemicals, Bisphenol A, Obesogen, Zebrafish

## GİRİŞ

Obezite, DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından vücutta sağlığı tehdit edecek ölçüde anormal veya aşırı yağ birikmesi şeklinde tanımlanmaktadır (DSÖ, 2018). DSÖ' nün raporlarına göre 2014 yılı kapsamında hafif şişmanlık ve obezite prevalansının sırasıyla % 39 ve % 13 olduğu belirtilmiştir (Killgore ve ark., 2003). Obezitenin neden olduğu bazı hastalıklar arasında insülin direnci, tip 2 diyabet (T2DM), kardiyovasküler hastalık, infertilite, osteoartirit ve bazı kanser türleri bulunmaktadır (Melissa, Danielle, 2014; Verma, Hussain, 2017). Obezite, kardiyovasküler hastalıkların risk faktörlerinden sayılan; toplam kolesterol, LDL kolesterol, triaçilgliserol, VLDL kolesterol artışı ve HDL kolesterol düşüklüğü ile karakterize olan dislipidemiye zemin hazırlamaktadır (Van Gaal ve ark., 2006). Özellikle abdominal obezite inflamatuar belirteçlerin artışına sebep olmakla birlikte protrombotik bir durum da oluşmaktadır: TNF-alfa, insülin benzeri büyüme faktörü-1, interlökin-6, leptin, lipoprotein lipaz, kolesterol ester transfer protein, retinal bağlayıcı protein, östrojen, anjiotensinojen ve rezistin gibi birçok adipokin ve kimyasalın proinflamatuar ve protrombotik etkileri endotelyal hasar ve vasküler hipertrofiye neden olarak kardiyovasküler sistem üzerinde olumsuz etkiye sebep olmaktadırlar (Mathew ve ark., 2008).

Obezojen olarak tanımladığımız maddeler çeşitli mekanizmalarla vücut lipit metabolizmasını düzenleyen olaylara etki ederek obezitenin gelişmesine neden olabilmekte ve bu mekanizmalarda genetik veya epigenetik faktörlerin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Genetik, epigenetik ve genetik olmayan faktörlerin tip 2 diyabetin patogenezini etkilediği bilinmektedir (Van Gaal ve ark., 2006; Mathew ve ark., 2008).

Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, bisfenol A (BFA) ile insan popülasyonlarındaki obezite arasındaki bağlantıyı desteklemektedir Endokrin bozucu maddelerden olan BFA'nın metabolik sendrom ve Tip2 diyabete yol açabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. BFA östrojenik etkisi ile vücut yağ dokusu üzerinde etkiler göstererek yağ hücresi oluşumunu artırmaktadır. Tokluktan sorumlu bir protein olan leptinin seviyeleri obezitede artar. Bu durum beyinde IL-1 salgısını arttırır, IL-6 ve TNF alfa üretiminin artmasını da sağlayarak insülin direnci oluşumunda rol alır. BFA'ya maruz kalmanın lipit metabolizmasını etkilediği ve hayvan çalışmalarında kilo alımını arttırdığı gösterilmiştir. (Do ve ark., 2017).

Obezite, böbrek hastalığının gelişimi için güçlü bir risk faktörüdür. Diyabet ve hipertansiyon gibi obezite de kronik böbrek hastalıkları için önemli risk faktörleri arasındadır. Obezitenin neden olduğu kompleks metabolik anomaliler, birçok organ sistemi ile beraber böbrekleri de etkiler. Obeziteden etkilenen bireylerde, artan vücut ağırlığının artan metabolik taleplerini karşılamak için telafi edici bir hiperfiltrasyon meydana gelir. İntraglomerüler basınçtaki artış böbreklere zarar verebilir ve uzun vadede KBH gelişme riskini artırabilir. Ancak obezitenin kronik böbrek hastalıklarının gelişimindeki rolünün mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Kovesdy ve ark., 2017).

Organ fizyolojisi ve metabolik yolakların yüksek benzerliği göz önüne alındığında zebra balıklarının diyabet ve ilişkili metabolizma hastalıklarında model organizma olarak kullanımı son yıllarda artmaktadır (Zang ve ark., 2017).

Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda 4 hafta boyunca 2 farklı dozda (düşük ve yüksek) BFA'ya maruz bırakılan yetişkin zebra balıklarında böbrek dokusundaki oksidan-antioksidan mekanizma incelenmiştir.

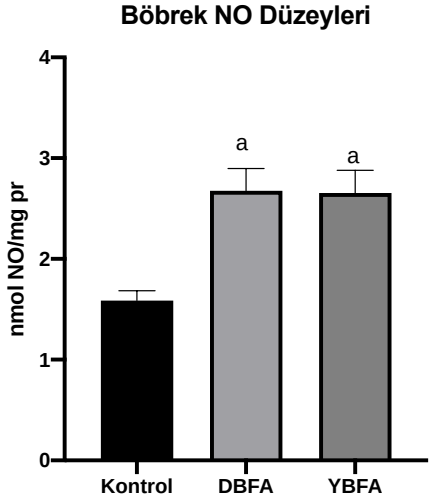
## METOD

Sağlıklı zebra balıkları (Danio rerio)(4-6 aylık) BFA oranına göre düşük doz grubu (DBFA), yüksek doz grubu (YBFA) ve kontrol grubu (K) olarak ayrılmıştır. Tüm gruplardaki zebra balıkları 4 hafta boyunca grup başına, günde 2 defaya bölünecek şekilde toplamda 600 mg ticari balık yemi ile beslenmiştir (TetraMin). Zebra balıkları, balık başına günde iki defa 10'ar mg (Günde toplam 20 mg) balık yemi ile beslenmiştir. Tetramin içeriği minimum %11 ham yağ, % 51 ham protein, % 2,3 kalsiyum, % 1,5 fosfor, maksimum % 15 kül, % 3 ham fiber ve % 6,5 nem şeklindedir. The granül boyutu 0.36–0.65 mm ve enerjisi 3.39 kcal/g'dır. Tüm grupların akvaryum suları haftada iki kere yenilenmiştir.

Deney sonunda böbrek dokularından hazırlanan homojenatlarda süperoksit dismutaz (Mylorie ve ark., 1986), nitrik oksit (Miranda ve ark., 2001) ve glutatyon-S-transferaz (Habig ve Jacoby, 1981) düzeyleri ölçülmüştür.

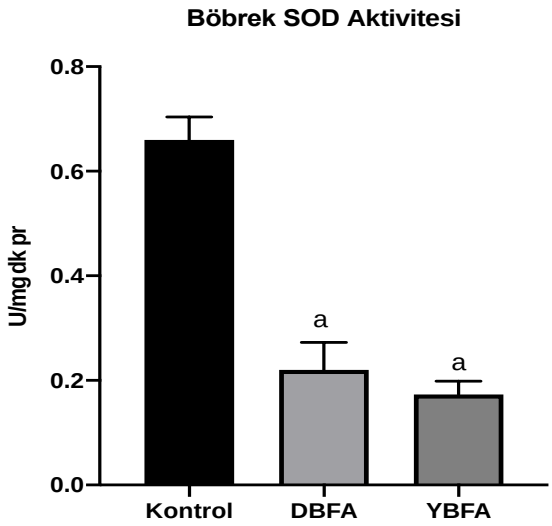
## BULGULAR ve TARTIŞMA

Böbrek dokusunda yapılan analizler sonucunda nitrik oksit düzeylerinde hem düşük doz hem de yüksek doz BFA uygulamasının kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir ($p< 0,05$) (Şekil 1).



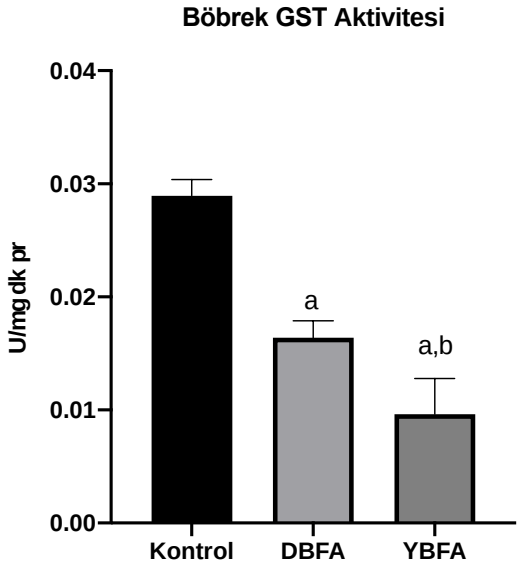

**Şekil 1:** Kontrol, Düşük Doz BFA (DBFA) ve Yüksek Doz BFA (YDBFA) gruplarında 30. günde belirlenen böbrek nitrik oksit (NO) düzeyleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a] $p< 0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

Böbrek dokusunda süperoksit dismutaz aktivitelerini düşük dozda ve yüksek dozda BFA uygulanması kontrole göre anlamlı derecede azaltmıştır. Bu azalma yüksek dozda BFA grubunda daha belirgin olarak kendini göstermiştir ($p< 0,05$) (Şekil 2).




**Şekil 2:** Kontrol, Düşük Doz BFA (DBFA) ve Yüksek Doz BFA (YDBFA) gruplarında 30. günde belirlenen böbrek süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a] $p< 0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

Böbrek Glutatyon-S-Transferaz aktivitesi düşük dozda BFA grubunda kontrole göre anlamlı derecede azalmıştır ($p< 0,05$). Yüksek dozda BFA grubunda ise hem kontrole hem de düşük dozda BFA grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p< 0,05$) (Şekil 3).




**Şekil 3:** Kontrol, Düşük Doz BFA (DBFA) ve Yüksek Doz BFA (YDBFA) gruplarında 30. günde belirlenen böbrek Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktiviteleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a] $p < 0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı [b] $p < 0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

Çalışmamızın sonuçlarına böbrek dokusunda BFA hem düşük hem de yüksek dozlarda nitrik oksit düzeylerini arttırıp süperoksit dismutaz ve glutatyon-S-transferaz enzim aktivitelerini azaltmıştır.

BFA ve obezite arasındaki ilişkiyi açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Örneğin, BFA'nın adiposit farklılaşmasını ve yağ birikimini desteklediği ve adipositlerdeki östrojen reseptörlerine bağlanarak adiponektin hormonunun salınmasını engellediği gösterilmiştir. Çoğu hayvan çalışması utero maruziyetine odaklanmakla beraber hem perinatal hem de postnatal dönemlerde BFA maruziyetinin farelerde kilo almaya yol açtığı da göstermiştir (Miyawaki ve ark., 2007).

Ayrıca yetişkin farelerde uzun süreli BFA'ya maruz kalmanın yağ dokusu kütlesini arttırdığı ve insülin direncini, hiperglisemi ve hiperkolesterolemiyi indüklediği gösterilmiştir (Marmugi ve ark., 2014). Bunlar obezite ve kardiyometabolik disfonksiyon gelişiminde BFA'nın rolünü düşündürmektedir. Benzer şekilde, epidemiyolojik çalışmalar, obeziteye ek olarak BFA'ya maruz kalmanın artmış diyabet ve kardiyovasküler bozukluk riski ile ilişkili olabileceğine dair artan kanıtlar sunmaktadır (Do ve ark., 2017).

Çok sayıda populasyon çalışmasında, obezite ile kronik böbrek hastalığı gelişimi ve ilerlemesi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Yüksek BKİ, böbrek hastalığı olmayan bireylerde proteinüri varlığı ve gelişimi ile ilişkilidir. Obezitenin böbrekler üzerindeki zararlı etkisi adiponektin, leptin ve resistin üretimi yoluyla adipoz dokunun endokrin aktivitesi ile indüklenen böbrek yağlanması ile ilişkilendirilmiştir. İnflamasyon gelişimi, oksidatif stres, anormal lipit metabolizması, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin aktivasyonu ile artan insülin ve insülin direnci üretimi de bu mekanizmada yer almaktadır (Do ve ark., 2017; Furukawa ve ark., 2004). Nitrik oksit, inflamasyon patogenezinde önemli bir rol oynayan bir sinyal molekülüdür. Normal fizyolojik koşullar altında antienflamatuar bir etki sağlar. Öte yandan nitrik oksit, anormal durumlarda aşırı üretime bağlı iltihaplanmayı indükleyen pro-enflamatuar bir aracı olarak kabul edilir (Sharma ve ark., 2007).

## SONUÇ

Bu bilgilere uygun olarak çalışmamızda literatürde ilk defa zebra balıklarında BFA ile oluşturulan obezite modelinde BFA'nın böbrek dokusundaki pro-enflamatuar etkileri artmış nitrik oksit düzeyleri ile antioksidan savunma sistemlerini baskılayıcı etkileri ise azalan superoksit dismutaz ile glutatyon-S-transferaz aktiviteleri ile gösterilmiştir.

**KAYNAKLAR**

Do MT, Chang VC, Mendez MA, de Groh M. Urinary bisphenol A and obesity in adults: results from the Canadian Health Measures Survey. Concentration urinaire de bisphénol A et obésité chez les adultes : résultats de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé. Health Promot Chronic Dis Prev Can. 2017;37(12):403–412.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.J Clin Invest. 2004 Dec; 114(12):1752-61.

Habig WH, Jacoby WB. Assays for differentation of glutathione-S-transferases. Methods in Enzymol 1981; 77:398-405.

Killgore WDS, Young AD, Femia LA. Cortical and limbic activation in response to low and high calorie food. Neuroimage 19(4):1381-94, 2003.

Kovesdy CP, Furth SL, Zoccali C; World Kidney Day Steering Committee. Obesity and Kidney Disease: Hidden Consequences of the Epidemic. Can J Kidney Health Dis. 2017;4:2054358117698669. Published 2017 Mar 8. doi:10.1177/2054358117698669

Marmugi A, Lasserre F, Beuzelin D, Ducheix S, Huc L, Polizzi A, Chetivaux M, Pineau T, Martin P, Guillou H, Mselli-Lakhal L. Adverse effects of long-term exposure to bisphenol A during adulthood leading to hyperglycaemia and hypercholesterolemia in mice. Toxicology. 2014 Nov 5; 325():133-43.

Mathew B, Francis L, Kayalar A. Obesity: Effects on cardiovascular disease and its diagnosis. J Am Board Fam Med. 21(6):562-8, 2008.

Melissa S, Danielle M. Obesity ıntroduction. Yale Journal Of Biology And Medicine 87: 97-98, 2014

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry Vol. 5, No. 1, pp. 62–71 (2001)

Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. J Atheroscler Thromb. 2007 Oct; 14(5):245-52.

Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte SOD activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. Toxicol Appl Pharmacol 1986; 82: 512-20

Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. Inflammopharmacology. 2007 Dec;15(6):252-9.

Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. Nature 444(7121), 875–880, 2006..

Verma S, Hussain ME. Obesity and diabetes: an update. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews 11(1): 73–79, 2017.

World Health Organization. Health Topics, Obesity. Erişim: (http://www.who.int/topics/obesity/en/) Erişim Tarihi: 22.02.2018

Zang L, Shimada Y, Nishimura N, Development of A Novel Zebrafish Model For Type 2 Diabetes Mellitus. Nature Scientific Reports 2017; 7: 1461

# Yapay aydınlatmanın pankreas gelişimi üzerine etkileri

Ünsal Veli Üstündağ[1*], İsmail Ünal[2], Derya Cansız[3], Ebru Emekli-Alturfan[2]

[*1]Istanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Istanbul, Türkiye
[2] Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri ABD, Istanbul, Türkiye
[3]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Biyokimya ABD, Istanbul, Türkiye

uvustundag@gmail.com

## Özet

Gün ışığı, biyolojik saatin korunmasında ve tüm canlı organizmalarda sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli bir faktördür. Öte yandan, bu doğal süreç, çeşitli elektromanyetik spektrumları içeren yapay ışık kaynakları tarafından sürekli olarak bozulmaktadır. Yapay aydınlatma, kentsel yaşamın önemli bir parçası haline gelmiştir. Öte yandan, yapay ışığa maruz kalma biyolojik metabolik süreçlerin eş zamanlı olarak düzenlenmesini zorlaştırmıştır. Gelişen teknoloji ile beraber son yıllarda artan yapay ışık kaynakları ve bu ışıklara maruziyet sirkadiyen ritmin bozulmasına neden olmaktadır. Özellikle bu amaçla kullanılan LED kaynaklı aydınlatmalar günlük hayatımızın bir parçası haline gelmiştir. Bununla beraber sirkadiyen ritm bozukluklarının doğal yaşam sürecinde meydana getirdiği değişiklikler metabolizmayı olumsuz yönde etkileyebilir. Yapay ışık kaynaklarına maruziyete bağlı sirkadiyen ritm bozukluklarının çeşitli hastalıklarla ilişkilendirildiği çalışmalar mevuttur. Yüksek vücut demir depoları oksidatif stresi artırabilir ve bu şekilde insülin direncinin patogenezini etkileyebilir. Zebra balıkları ve embriyoları son yıllarda kullanımı yaygınlaşan model organizmalardır. Zebra balıklarında embriyolar eksternal fertilizasyonla oluşur ve embriyo gelişim evrelerini dış ortamda tamamlar. Bu nedenle zebra balığı embriyosu özellikle gelişim biyolojisi ile ilgili çalışmalarda kullanışlı modeller olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda farklı dalga boylarında ışık yayan diyotların normal gelişim sürecindeki zebra balığı embriyolarında ferritin kodlayan gen *fth1b* geninin ekspresyonu RT-PCR yöntemi incelenmiştir. Çalışmamızın sonucunda farklı LED ışık kaynaklarının zebra balığı embriyosunda *fth1b* geni ekspresyonunu farklı yönde etkilediği gösterilmiştir. Bulgularımız embriyonel dönemde sirkadiyen ritmin, demir ve pankreas ilişkisine etkisinin önemini vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Sirkadiyen ritm, LED ışık kaynakları, pankreas, demir, Zebra balığı embriyosu

## Abstract

Daylight is an important factor in maintaining the biological clock and regulating the circadian rhythm in all living organisms. On the other hand, this natural process is constantly disrupted by artificial light sources containing various electromagnetic spectrum. Artificial lighting has become an important part of urban life. On the other hand, exposure to artificial light has made it difficult to regulate biological metabolic processes simultaneously. With the developing technology, artificial light sources increasing in recent years and exposure to these lights cause disruption of the circadian rhythm. LED source lighting used for this purpose has become a part of our daily life. However, changes caused by circadian rhythm disorders in the natural life process may adversely affect metabolism. There are studies in which circadian rhythm disorders due to exposure to artificial light sources are associated with various diseases. High body iron stores can increase oxidative stress and thereby affect the pathogenesis of insulin resistance. Zebra fish and embryos are model organisms that have become widespread in recent years. In zebrafish, embryos are formed by external fertilization and complete the embryo development stages externally. Therefore, the zebrafish embryo is considered useful models especially in studies related to developmental biology. In our study, the effects of different light spectrum conditions were investigated to the gene encoding ferritin (*fth1b*) expression in the normal development process of zebrafish embryos. As a result of our study, different LED light sources have been shown to affect *fth1b* gene expression in a different direction in zebrafish embryos. Our findings emphasize the importance of circadian rhythm on the relationship between iron and pancreas in embryonic period.

**Keywords:** Circadian rhythm, LED light sources, pancreas, iron, Zebrafish embryo

## GİRİŞ

Gelişen teknoloji ile beraber son yıllarda artan yapay ışık kaynakları ve bu ışıklara maruziyet sirkadiyen ritmin bozulmasına neden olmaktadır. Özellikle bu amaçla kullanılan LED kaynaklı aydınlatmalar günlük hayatımızın bir parçası haline gelmiştir. Bununla beraber sirkadiyen ritm bozukluklarının doğal yaşam sürecinde meydana getirdiği değişiklikler metabolizmayı olumsuz yönde etkileyebilir. Yapay ışık kaynaklarına maruziyete bağlı sirkadiyen ritm bozukluklarının çeşitli metabolik hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir (Park ve ark., 2019).
Zebra balıkları ve embriyoları son yıllarda kullanımı yaygınlaşan model organizmalardır. Zebra balıklarında embriyolar eksternal fertilizasyonla oluşur ve embriyo gelişim evrelerini dış ortamda tamamlar. Bu nedenle zebra balığı embriyosu özellikle gelişim biyolojisi ile ilgili çalışmalarda kullanışlı modeller olarak değerlendirilmektedir.
Artan serbest oksijen radikallerinin ve lipit peroksidasyonun, birçok farklı hastalığın patogenezinde rol aldığı son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle diyabette serbest oksijen radikallerinin ve lipit peroksidasyonun arttığı bu nedenle oksidatif stresin diabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Pankreas beta hücreleri oksidatif strese en duyarlı organlardan biri olarak kabul edilmekte ve bu duyarırlılığın nedeni hipergliseminin toksik etkilerine bağlanmaktadır (Robertson ve ark., 2004).
Hücre içindeki demir miktarı, hücresel proteinler aracılığıyla demirin toksik seviyelerde birikmesini önlerken yeterli miktarda mikrobesin sağlayacak şekilde dikkatlice düzenlenir. Demir fazlalığının, oksijen radikali ara maddelerin konsantrasyonunda artış ile kendini gösteren oksidatif stres oluşturduğu bilinmektedir. Serbest demir, Fenton tipi reaksiyonlarla süperoksit radikali ve hidrojen peroksitten reaktif nitelikteki hidroksil radikallerinin oluşumunu ve oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında elektronların NAD(P)H'den oksijene transferini katalizleyebilir. Ayrıca lipit hidroperoksitler ile reaksiyona girmek sureti ile daha reaktif türlerin oluşumuna neden olabilir. Diyet dengesinin bozulması, enflamasyon, enfeksiyon ve stress kaynakları demir gibi geçiş elementlerinin serbestleşmesine neden olabilir (Puntarulo, 2005).
Bir hücre içi protein ve demir homeostazisinin kilit düzenleyicisi olan ferritin, vücut demir depolarının klinik bir göstergesidir. Yüksek ferritin düzeylerinin ise oksidatif stres artışına neden olarak pankreas hasarı ile insülin direncinin patogenezinde etkili olabileceği öne sürülmüştür. Zebra balıklarında *fth1b* geni tarafından kodlanan fth1b (ferritin, ağır polipeptid 1b) ferroksidaz, protein ve demir iyonu bağlanma aktivitelerine sahiptir. Sitoplazmada lokalize olduğu tahmin edilmektedir. Bu amaçla çalışmamızda insanlarda ferritin kodlayan genlerden FTH1 (ferritin ağır zincir 1) ortoloğu olan *fth1b*'nin ekspresyon düzeyleri farklı LED ışık kaynaklarına maruziyet durumlarında incelenmiştir.
Çalışmamızın amacı farklı dalga boylarında ışık yayan diyotların normal gelişim sürecindeki zebra balığı embriyolarında pankreas gelişimi ve beta hücre fonksiyonları üzerine etkilerinin *fth1b*'nin ekspresyon düzeyleri üzerinden ilişkilendirilmesidir.

## MATERYAL ve METOT

Yabani tip AB/AB suşu yetişkin zebra balıkları, akvaryum raf sisteminde (Zebtec, Tecniplast, İtalya) 14/10 saatlik aydınlık / karanlık döngüsü altında 27 ± 1 ° C'de tutuldu. Yetişkin zebra balıklarından elde ettiğimiz toplamda 480 adet zebra balığı embriyosu SteREO Discovery V8 (Carl Zeiss**,** Göttingen, Almanya) steromikroskop kullanılarak gruplara ayrılmıştır. Kontrol grubundaki embriyolar 3200 Kelvin normal ışığa maruz bırakılmıştır. Diğer gruplar sırasıyla Mavi (455-475 nm), Yeşil (515-535 nm) Amber (585-595 nm) Derin Kırmızı (650-670 nm), Beyaz (7500 Kelvin) LED ışıklara 72 saat boyunca maruz bırakılmıştır (0,5 Watt Gücünde). Embriyolar deney düzeneğinde petri kapları içinde, E3 embriyo ortamında 28 $^{0}$C'de etüvde muhafaza edilerek, 14 saatlik aydınlık süreç boyunca ışık maruziyeti gerçekleştirilmiştir. LED aydınlatma kaynaklarının spektrum aralıkları, kelvin değerleri Sekonic C-700R SpectroMaster (Tokyo, Japonya) spektrometre ile teyid edilmiştir.

### RNA İzolasyonu

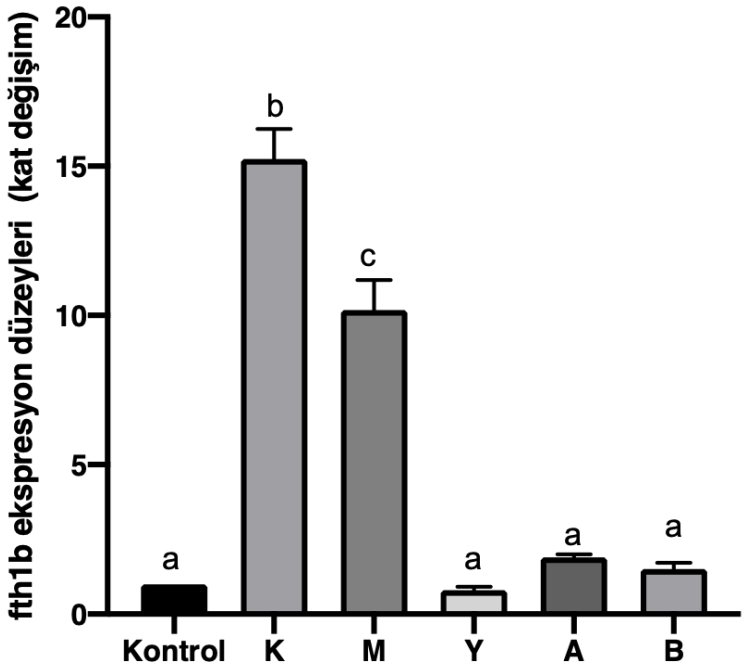
Işık maruziyetinin sonunda (72. saat), deney gruplarının RNA izolasyonları RNeasy Mini Kit ile QIAcube (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyonu amacıyla, RLT lizis tamponu eklenerek lizatlar elde edilmiştir. Etanol ilavesi sonrası RNA'nın RNeasy membranına bağlanabilmesi için gerekli işlemlerden geçirilen örnekler RNase-free su ile RNeasy spin kolonu yardımıyla RNA elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA RT$^{2}$ First Strand Kit ile Rotor Gene-Q (Qiagen) kullanılarak sentezlenmiştir. PCR yöntemi ile *fth1b* gen ifadeleri incelenmiştir.

**Real Time (Eş zamanlı) RT-PCR Uygulaması**

Gen ekspresyon düzeyleri Qiagene RT SYBR Green kiti kullanılarak Rotor-Gene Q (Qiagen) ile belirlenmiştir. Verilerin istatiksel anlamlılıkları Graph Pad 7 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) istatistik programında değerlendirilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçlarına göre farklı LED ışık kaynaklarına maruziyet sonucunda Kırmızı LED ışık grubundaki *ftht1b* ekspresyon düzeyleri Kontrol grubu, Mavi, Yeşil, Amber ve Beyaz LED ışık gruplarına göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$). Mavi LED ışık grubunda ise *ftht1b* ekspresyon düzeyleri Kontrol grubu, Yeşil, Amber ve Beyaz LED ışık gruplarına göre anlamlı olarak artmış; Kırmızı LED ışık grubuna göre ise azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 1).




**Şekil 1:** Kontrol, Kırmızı (K), M (Mavi), Yeşil (Y), Amber (A), Beyaz (B) LED gruplarında *ftht1b* ekspresyon düzeyleri. Gruplar arasında farklı harfler anlamlı derecede farklılık göstermektedir, $p<0,05$.

Yüksek vücut demir depoları oksidatif stresi artırabilir ve bu şekilde insülin direncinin patogenezini etkileyebilmektedir. Yüksek serum ferritin düzeyleri ile yüksek serum insülin, açlık glikozu, insülin direnci ve diyabet arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Ayrıca metabolik sendrom ve serum ferritin düzeyleri arasında bir ilişki olabileceği ileri sürülmüştür (Hämäläinen ve ark., 2014).

Serum ferritin seviyelerinin artışı ile metabolik sendrom altında yatan mekanizma ile buna bağlı metabolik sendrom gelişimi tam olarak açık değildir. Ancak demir birikimi ve oksidatif stres önde gelen hipotezdir. Demir çoklu hücresel süreçlerde rol oynar ve çeşitli enzimlerin aktivitesi için önemlidir, fakat aynı zamanda toksik olabilir ve organik biyomoleküler oksidasyona neden olabilir. Ferritin vücut demir depolarının klinik bir ölçümüdür. Yüksek vücut demir depoları, insülin disfonksiyonuna, insülin direncine ve anormal pankreatik beta hücre fonksiyonuna yol açan hücresel hasara katkıda bulunan oksidatif stresi artırabilir. Karaciğer aşırı demir yükünün periferik hiperinsülinemi ve insülin direncine katkıda bulunduğu, kas demir birikiminin ise glikoz kullanımının azalmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Kronik oksidatif stres, mitokondride uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu ve disfonksiyonu ile ilişkilidir, bu da dolaşımda hipertrigliseridemiye ve kas ve karaciğer dokusunda aşırı trigliserit birikimine yol açabilir (Houschyar ve ark., 2012).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda kırmızı ve mavi LED ışık kaynaklarına maruz bıraklan embriyolarda ferritin kodlayan genlerden FTH1 (ferritin ağır zincir 1) ortoloğu olan *fth1b*'nin ifadelerindeki artış bu gruplarda oksidatif stres artışına neden olabilir. Daha önceki çalışmalarımızda LED ışık maruziyetinin zebra balığı

embriyolarında oksidatif hasarı arttırdığını göstermiştik (Üstündağ ve ark., 2019). Mavi ve kırmızı ışık maruziyeti olan embriyolarda artan artan *ftht1b* ve buna bağlı olarak artacak olan oksidatif stresin pankreas beta hücrelerinde hasara neden olarak pankreas gelişimi olumsuz yönde etkileyecek olması muhtemeldir. LED ışık kaynaklarının embriyonel gelişim sürecinde pankreas gelişimi üzerine olan etkilerinin aydınlatabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

Hämäläinen P, Saltevo J, Kautiainen H, Mäntyselkä P, Vanhala M 2014. Serum ferritin levels and the development of metabolic syndrome and its components: a 6.5-year follow-up study. Diabetology & Metabolic Syndrome, 6(1):114.

Houschyar KS, Lüdtke R, Dobos GJ, Kalus U, Broecker-Preuss M, Rampp T, Brinkhaus B, Michalsen A 2012. Effects of phlebotomy-induced reduction of body iron stores on metabolic syndrome: results from a randomized clinical trial. BMC Medicine, 30:10(1);54.

Üstündağ, ÜV, Çalıskan-Ak E, Ateş PS, Ünal İ, Eğilmezer G, Yiğitbaşı T, Emekli-Alturfan, E 2019. White LED Light Exposure Inhibits the Development and Xanthophore Pigmentation of Zebrafish Embryo. Scientific reports, *9*(1):1-12.

Park YMM, White AJ, Jackson CL, Weinberg CR, Sandler DP 2019. Association of exposure to artificial light at night while sleeping with risk of obesity in women. *J*AMA internal medicine, 179(8):1061-1071.

Puntarulo S 2005. Iron, oxidative stress and human health. Molecular Aspects of Medicine, Aug-Oct; 26(4-5):299-312.

Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V 2004. β-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative street inn type 2 diabetes. Diabetes, 53(Supplement 1):119-124.

# Nörotoksin maruziyeti durumunda 3-piridin boronik asidin etkileri

Fümet Duygu Üstündağ[1*], İsmail Ünal[2], Derya Cansız[3], Ünsal Veli Üstündağ[4], Hülya Kara Subaşat[5], Pınar Mega Tiber[1], Ebru Emekli-Alturfan[2]

[1]Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik ABD, İstanbul, Türkiye
[2]Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri ABD, İstanbul, Türkiye
[3] İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Biyokimya ABD, İstanbul, Türkiye
[4]İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, İstanbul, Türkiye
[5]Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Enerji ABD, Muğla, Türkiye

*fdyazici@gmail.com

## Özet

Dikkat çekici özelliklere sahip olan bor içeren bileşikler son zamanlarda bilimsel çevrelerden ve özellikle de ilaç endüstrisinden artan ilgi görmüştür. Bor içeren bileşiklerin antibakteriyel, antifungal, antiparaziter, antiviral ve antienflamatuar aktiviteleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Boronik asit bileşikleri, çok özel yapısal özelliklerinden dolayı potansiyel enzim inhibitörlerinin üretilmesi, kanser terapisi ve antikorların yönlendirilmiş immobilizasyonu için kullanılmıştır. Son yapılan çalışmalar, bor içeren bazı bileşiklerin Alzheimer hastalığında olumlu etki gösterebileceğini öne sürmüştür. Bu bileşiklerin potansiyel antioksidanlar olarak hareket ederek Aβ agregasyonunu inhibe edebileceği gösterilmiştir. Parkinson hastalığı (PH) dünya üzerinde en yaygın olarak görülen ikinci nörodejeneratif bozukluktur. PH'nin nörodegeneratif yönü farklı tipteki nöronların selektif bir şekilde ölmesi ile bağlantılıdır. Nörotoksin 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinin (MPTP), insanlarda dopaminerjik nöron kaybına neden olarak PH benzeri semptomlara neden olduğu bilinmektedir. Primatlar, fareler, akvaryum balığı ve son olarak zebra balığı dahil olmak üzere birçok hayvan türü MPTP'ye duyarlılık göstermiştir. MPTP, geri dönüşümsüz ciddi PH semptomları oluşturur ve PH'nin ana belirtilerinin (titreme, katılık, yavaş hareket etme, duruşta dengesizlik ve donma) tamamına neden olur. MPTP lipofiliktir ve kolayca kan-beyin bariyerini geçer. Mitokondri içine giren MPTP metaboliti olan $MPP^+$, mitokondrial kompleks I'i inhibe eder, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırır ve ATP'yi azaltır. Dopaminerjik sistem zebra balığında hem embriyonik hem de yetişkinlik döneminde iyi karakterize edilmiştir. Bu nedenden dolayı zebra balığı ve embriyosu nöronal araştırmalar için güçlü bir model olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda zebra balığı embriyolarında MPTP toksisitesi durumunda 3-piridin boronik asidin etkileri pro-enflamatuar sitokinler *ifn-γ* ve *tnf-α* ile apaptoz belirteci *casp2* üzerinden ilk defa incelenmiş, mortalite ve lokomotor aktivite üzerinde doza bağlı değişen etkileri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** 3-piridin boronik asit, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin, parinson hastalığı, zebra balığı embriyosu

# Effects of 3-Pyridinylboronic Acid in case of Neurotoxin Exposed

## Abstract

Boron-containing compounds, which have remarkable properties, have recently gained increasing interest from scientific circles and especially the pharmaceutical industry. Antibacterial, antifungal, antiparasitic, antiviral and anti-inflammatory activities of boron-containing compounds have been shown in several studies. Boronic acid compounds have been used for the production of potential enzyme inhibitors, cancer therapy, and directed immobilization of antibodies due to their very specific structural properties. Recent studies have suggested that some boron-containing compounds may have a positive effect on Alzheimer's disease. These compounds have been shown to act as potential antioxidants and can inhibit Aβ aggregation. Parkinson's disease (PH) is the second most common neurodegenerative disorder in the world. The neurodegenerative aspect of PH is associated with the selective death of different types of neurons. Neurotoxin 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is known to cause dopaminergic neuron loss in humans, causing PH-like symptoms. Many animal species have been susceptible to MPTP, including primates, mice, goldfish, and finally zebrafish. MPTP creates irreversible severe PH symptoms and causes all of the main symptoms of PH (chills, stiffness, slow movement, posture imbalance and freezing). MPTP is lipophilic and easily crosses the blood-brain barrier. $MPP^+$, the MPTP metabolite that enters the mitochondria, inhibits mitochondrial complex

I, increases the formation of reactive oxygen species and reduces ATP. The dopaminergic system has been well characterized in zebrafish, both embryonic and in adulthood. For this reason, zebrafish and embryo are accepted as a powerful model for neuronal research. In our study, the effects of 3-pyridine boronic acid in the zebrafish embryos in the case of MPTP toxicity were examined for the first time on pro-inflammatory cytokines, *ifn-γ* and *tnf-α*, on apoptosis marker *casp2*, and the dose-related effects on mortality and locomotor activity were determined.

**Keywords:** 3-pyridinylboronic acid, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, parkinson's disease, zebrafish embryo, inflamation, apoptosis

## GİRİŞ

Substantia Nigra pars kompakta'da (SNPpc) dopaminerjik nöronların kaybı ile karakterize olan Parkinson Hastalığı'nın (PH) nedenleri hala bilinmemektedir. Esas olarak oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve otofajiye odaklanılan birçok olası mekanizmalar arasındadır (Barcia ve ark., 2011). İnflamasyon, PH sürecinde dikkate alınması gereken bir başka önemli konudur. Parkinson hastalarının SNpc'sinin ölüm sonrası analizinde, mikroglial ve astroglial hücrelerin sinir dejenerasyonunda inflamasyonun rolünün olduğu gösterilmiştir (McGeer ve ark., 1988). Pro-enflamatuar sitokinler, özellikle beyindeki glial aktivasyonun başlaması sırasında çeşitli noktalarda PH patogenezinde rol oynar (Mount ve ark., 2007). Parkinson hastalarının kanında bu pro-inflamatuar sitokinlerin artmış seviyeleri bildirilmiştir. Buna göre interferon-gama (IFNγ) içeren sitokinlerin yanı sıra tümör nekroz faktör-alfa 'nın (TNFα) dopaminerjik nöronların dejenerasyonunda yer aldığı önerilmiştir (Barcia ve ark., 2011, Mount ve ark., 2007, Mogi ve ark., 1994).

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), dopaminerjik nöronların spesifik olarak hasar görmesine ve ölümüne neden olan bir nörotoksindir. MPTP maruziyetinin PH da glial reaksiyona ve uzun yıllar devam eden inflamatuar yanıta neden olduğu gösterilmiştir (Barcia ve ark., 2004, McGeer ve ark., 2003).

Boronik asitler ve türevlerinin antibakteriyel, antifungal, antiparaziter, antiviral ve antienflamatuar aktiviteleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Farmasötikler, potansiyel enzim inhibitörlerinin üretilmesi, kanser terapisi, antikorların yönlendirilmiş immobilizasyonu ve daha birçok alanda kullanılmaktadır. (Yahşi ve ark.,2015, António ve ark.,2019).

Boronik asitler, bor atomunun boş orbitalinden dolayı yumuşak Lewis asidi özelliği göstermektedir. Bu özellik, boronik asitleri özellikle reseptör ve biyolojik olarak daha da çekici kılmaktadır. Suda çözünebilen küçük boronik asitlerin çok düşük toksisiteye sahip olduğu söylenmektedir. Buda, farmasötik ajanların geliştirilmesi ve sentezinde popülaritesinin nedenlerinden biridir (Hansen ve ark.,2015, António ve ark.,2019).

Son yapılan çalışmalar, bor içeren bazı bileşiklerin yaşlanma ve Alzheimer hastalığında olumlu etki gösterebileceğini öne sürmüştür. Bu bileşiklerin potansiyel antioksidanlar olarak hareket ederek Aβ agregasyonunu inhibe edebileceği gösterilmiştir (Lu ve ark.,2018). Bunun yanısıra, borun karaciğer, böbrek ve beyin dokularında histopatolojik etkilere karşı koruyucu görev yaptığı, antioksidan savunma mekanizmasını desteklediği, hasar gören dokuların iyileşmesine katkı sağladığı ve oksidatif stresi azalttığı gözlenmiştir (Coban ve ark., 2015).

Omurgalı hayvanlar olan zebra balıkları (Danio rerio), Drosophila veya C. elegans gibi diğer model organizmalarla karşılaştırıldığında insanlarla daha yakın benzerlik gösterir. Zebra balığı embriyoları eksternal olarak gelişir ve şeffaftır, bu da onları genetik olarak manipüle edilmeye daha kolay hale getirir (Bretaud ve ark., 2007). Zebra balığı embriyolarında dopaminerjik sistem iyi karakterize edilmiştir ve dopaminerjik nöronlar ilk olarak 19 hpf'de (fertilizasyon sonrası 19.saat) gözlemlenebilir. Zebra balığı embriyolarının nörotoksin MPTP'ye duyarlı olduğu gösterilmiştir (Bretaud ve ark., 2007, Unal ve Emekli-Alturfan, 2019).

Çalışmamızın amacı, 3-Piridin boronik asidin MPTP'ye maruz kalan zebra balığı embriyolarında pro-enflamatuar sitokinler *ifn-γ*, *tnf-α* ile apoptozda görev alan *casp2* ifadeleri üzerine etkilerinin incelenmesidir.

## MATERYAL VE METOT

### Kimyasallar

MPTP (CAS no. 23007-85-4) ve 3-Piridinilboronik asit (CAS no. 1692-25-7) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Sentez ve kristalizasyon, özel önlemler alınmadan standart cam kaplarda havada gerçekleştirildi. 3-Piridinilboronik asidin seyreltik bir HCl çözeltisinin tamamen buharlaştırılması, böylece beyaz kristallerin oluşması sağlandı. Oluşan kristaller toplandı ve etanol ile yıkanıp açık havada kurutuldu.

### Zebra Balıklarının Bakımı

Yabani tip AB / AB suşu zebrabalıkları, akvaryum raf sisteminde (Zebtec, Tecniplast, İtalya) 14/10 saatlik aydınlık / karanlık döngü altında 27 ± 1 ° C'de tutuldu ve günde iki kez canlı Artemia ile desteklenen ticari pul balık yemi ile beslendi. Fertilizasyon sonrası embriyolar daha önce literatürde gösterildiği gibi gelişim ve morfolojilerine göre toplandı ve evrelendi (Westerfield,1995).

### Embriyo maruziyeti

Embriyolar Kontrol grubu (n:20), MPTP (800 µM) grubu (n:20) ve MPTP + 3-Piridinilboronik asit (800 µM MPTP + 50 µM PBA) grubu (n:20) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Her maruziyet grubunun, gelişim, mortalite ve kuluçka analizleri 72 saat boyunca stereomikroskop (Zeiss Discovery V8, Almanya) altında izlendi. Maruziyet gruplarının çözeltileri her gün taze çözeltilerle değiştirildi. (Westerfield,1995).

### RNA İzolasyonu ve RT-PCR Uygulaması

72. saatin sonunda embriyolardan Rneasy Mini Kit ve Qiacube (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RT$^2$ First Strand Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak RNA'dan tek sarmallı bir cDNA üretildi. RT-PCR'leri gerçekleştirmek için DNA Master SYBR Green kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı. *tnf-α, ifn-γ* ve *casp2* genlerinin ekspresyon seviyeleri, *β-actin* geni kullanılarak normalleştirilmesine dayanan ΔΔCT yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Kullanılan primerlerin listesi Tablo 1'de verilmiştir.

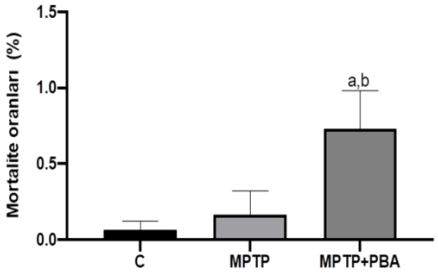
**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan forward ve reverse primerler

| | | |
|---|---|---|
| *tnf-α* | forward primer | 5'-GCTGGATCTTCAAAGTCGGGTGTA-3' |
| | reverse primer | 5'-TGTGAGTCTCAGCACACTTCCATC-3' |
| *ifn-γ* | forward primer | 5'-GCTGGATCTTCAAAGTCGGGTGTA-3' |
| | reverse primer | 5'-TGTGAGTCTCAGCACACTTCCATC-3' |
| *casp2* | forward primer | 5'-ATGTTGGGAGAGTGC-3' |
| | reverse primer | 5'-TTAGTTGCTGGGGTAG-3' |
| *β-actin* | forward primer | 5'-AAGCAGGAGTACGATGAGTCTG-3' |
| | reverse primer | 5'-GGTAAACGCTTCTGGAATGAC-3' |

## BULGULAR

### Ölüm oranı analizi

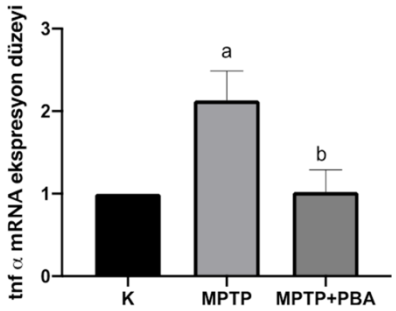
Zebra balığı embriyolarının 72 saatteki ölüm oranları Şekil 1'de verilmiştir. Grupların mortalite oranları tüm gruplarda çok düşüktü. Kontrol ve MPTP gruplarında sırasıyla % 0,66 ve % 0,16 olarak bulundu. MPTP ve 3-piridinilboronik asit (PBA) ile maruz bırakılan embriyolarda mortalite oranı ise % 0,73 idi. MPTP + PBA grubu kontrol grubuna göre mortalite oranlarında artış gösterse de, mortalite yüzdeleri çok düşük olduğu için, maruz bırakılan kimyasalların ölüme neden olacak düzeyde olmadığını gösterdi.




**Şekil 1.** Fertilizasyon sonrası 72. saatteki ölüm oranları
Grupların ölüm oranları. [a]p<0,05 Kontrol grubundan farklı,
[b]p<0,05 MPTP grubundan farklı

### *tnf-α* Ekspresyon Düzeyleri

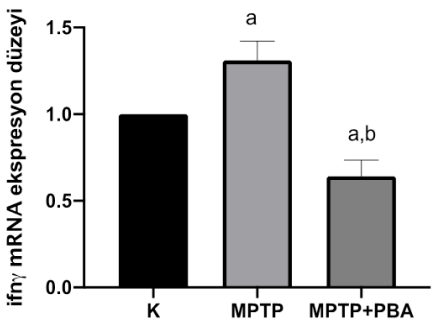
Grupların *tnf-α* ekspresyonları Şekil 2'de verilmiştir. *tnf-α* 'nın mRNA ekspresyon seviyeleri, MPTP grubunda Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde artışı görülmektedir (p <0,05). MPTP + PBA grubu MPTP grubu ile karşılaştırıldığında ise *tnf-α* ekspresyon düzeyini anlamlı derecede azalttığı görülmektedir (p<0,05).




**Şekil 2.** Grupların *tnf-α* ekspresyon düzeyleri. Ekspresyon düzeyleri kat değişim şeklinde belirlenmiştir. Tüm RT-PCR sonuçları house keeping geni olan *β-aktin*'e göre normalize edilmiştir. Ortalama değerler üç tekrarlı deneyden elde edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a]p <0.05 kontrol grubundan anlamlı olarak farklı; [b]p <0.05 MPTP grubundan anlamlı olarak farklı.

### *ifn-γ* Ekspresyon Düzeyleri

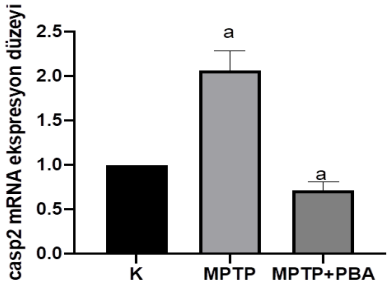
Grupların *ifn-γ* ekspresyonları Şekil 3'te verilmiştir. *ifn-γ* 'nın mRNA ekspresyon seviyeleri, MPTP grubunda Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde artışı görülmektedir (p <0,05). MPTP + PBA grubu MPTP grubu ile karşılaştırıldığında ise *ifn-γ* ekspresyon düzeyini anlamlı derecede azalttığı görülmektedir (p<0,05).




**Şekil 3.** Grupların *ifn-γ* ekspresyon düzeyleri. Ekspresyon düzeyleri kat değişim şeklinde belirlenmiştir. Tüm RT-PCR sonuçları house keeping geni olan *β-aktin*'e göre normalize edilmiştir. Ortalama değerler üç tekrarlı deneyden elde edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a]p <0.05 kontrol grubundan anlamlı olarak farklı; [b]p <0.05 MPTP grubundan anlamlı olarak farklı.

### *casp2* Ekspresyon Düzeyleri

Grupların *casp2* ekspresyon düzeyleri incelendiğinde MPTP grubunda *casp2* ekspresyon düzeyinin kontrole göre anlamlı derecede arttığı belirlendi (p<0,05). MPTP+PBA grubunda ise *casp2* ekspresyon düzeyleri MPTP grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (p<0,05) (Şekil 4).




**Şekil 4:** Grupların *casp2* ekspresyon düzeyleri. Ekspresyon düzeyleri kat değişim şeklinde belirlenmiştir. Tüm RT-PCR sonuçları house keeping geni olan *β-aktin*'e göre normalize edilmiştir. Ortalama değerler üç tekrarlı deneyden elde edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a]p <0.05 kontrol grubundan anlamlı olarak farklı

## TARTIŞMA

TNF-α gibi proenflamatuar sitokinlerin nörodejeneratif hastalıklarda etkileri hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Proinflamatuar sitokinlerin, oksidatif stres, inflamasyon ve PH gibi Nörodejeneratif hastalıklarda mitophaji gelişmesiyle artması muhtemeldir (Greenamyre ve ark.,1999, Nagatsu ve ark.,2000, Liu ve Hong,2003).

MPTP ile indüklenen PH'de daha önce proinflamatuar sitokin düzeylerinde artış bildirilmiştir (Czlonkowska ve ark.,1996, Kohutnicka ve ark.,1998, Kurkowska-Jastrzebska ve ark.,1999). Dahası, idiyopatik parkinson hastalarından alınan beyin numunelerinde TNF-α ve diğer proenflamatuar sitokinlerin artmış seviyeleri görülmüştür (Mogi ve ark.,1994, Kruger ve ark.,2000).

Bizim çalışmamızda MPTP maruziyeti *tnf-α* ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır. Önceki bir çalışmada TNF-α'nın mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu aktive ettiği ileri sürülmüştür (Goossens ve ark.,1995). MPTP lipofilik bir yapıya sahip olduğu için kan-beyin bariyerini geçebilir ve beynin içinde, astrositlerde MPTP toksik, 1-metil-4-fenilpiridinyum ($MPP^+$) haline dönüştürülür. Dopaminerjik nöronların sitoplazmasında MPP +, mitokondriyal kompleks I'i inhibe eder ve ATP tükenmesine ve oksidatif strese yol açar (Kruger ve ark.,2000, Goossens ve ark.,1995). Buna göre çalışmamızda MPTP grubunda artmış ROS *tnf-α* ekspresyonunda artışa neden olmuş olabilir.

IFN-γ, farklı bağışıklık tepkilerinin aktive edilmesinde ve düzenlenmesinde hayati rol oynayan bir sitokindir. Mikroglial aktivasyon, PH patojenezinin ve IFN-γ düzenleyici mikroglial acitons dahil proinflamatuar sitokinlerin merkezindedir. Parkinson hastalarının kandaki IFN-γ düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (Mount ve ark.,2007). Daha önce in vivo ve in vitro çalışmalarda IFN-γ ve TNF-α 'nın kritik rolleri olduğu ve glial aktivasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Mount ve ark.,2007, Ferger ve ark.,2004). Buna göre, hem IFN-γ hem de TNF-α 'nın PH'da lokal inflamasyonu inhibe etmek için terapötik hedefler olduğu ileri sürülmüştür (Barcia ve ark.,2011). Ferger ve arkadaşları, TNF-α'nın farmakolojik inhibisyonunun PH'da PH ve mikroglial yanıtı tedavi etmek için umut verici bir hedef olabileceğini göstermiştir (Ferger ve ark.,2004).

Kaspazlar arasında kaspaz-2, hem başlatıcı hem de infazcı kaspaz görevini üstlenmiştir. Kaspaz-2 eksikliği olan nöronlar β-amiloid ile oluşan apoptoza dirençlidir. Kaspaz-2'nin aktivasyonu ise iskemi sonrası hipokampal nöronların apoptozuna aracılık etmektedir. Ayrıca beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) nöroprotektif etkisinin kaspaz-2 aktivitesinin azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kurokawa ve

rak.,1999). Çalışmamızda MPTP verilen grupta artmış olan *casp2* ekspresyonu, 3-piridin boronik asit uygulanan MPTP grubunda azalmıştır.

Çoban ve arkadaşları bor bileşiklerinin oksidatif stres etkilerini baskıladığı, karaciğer, böbrek ve beyin dokularında histopatolojik etkilere karşı koruyucu görev yaptığını, hasar gören dokuların iyileşmesine katkı sağladığını, antioksidan savunma mekanizmasını desteklediği ve oksidatif stresi düşürdüğünü göstermiştir. (Coban ve ark.,2015). Bazı bor içeren bileşikler, yaşlanma ve Alzheimer hastalığında (AD) bilişsel gelişmeyi etkilediği gösterilen fosfodiesteraz 4 enzimine (PDE4) ve inflamasyonla ilişkili sitokin salımına karşı inhibitör aktivite göstermiştir (Lu ve ark.,2018). Oksidatif stres, enflamatuar hastalıklar sırasında önemli bir rol oynar ve oksidatif stresi azaltmak için antioksidan uygulaması, enflamatuar süreçleri durdurabilir. Borun, bazı enflamatuar aracıları modüle ettiği ve enflamatuar süreçleri düzenlediği, borik asitin TNF-α oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Cao ve ark. 2008). Çalışmamızda MPTP + PBA grubu MPTP grubu ile karşılaştırıldığında *tnf-α* ve *ifn-γ* ekspresyon düzeyini anlamlı derecede azalttığı görülmektedir.

Bulgularımız MPTP toksisitesi durumunda 3-piridin boronik asidin zebra balığı embriyolarında hem kaspaz 2 ile indüklenen apoptoza hem de enflamasyona karşı koruyucu etkisini göstermiştir.

## SONUÇ

Sonuç olarak MPTT'ye maruz kalan zebra balığı embriyoları üzerinde 50 µM 3-piridin boronik asidin faydalı etkileri gözlenmiştir. Bununla birlikte, nörotoksine maruz kalma durumunda 3-piridin boronik asidin etkilerini tam olarak göstermek için, farklı ve özellikle yüksek dozlarda 3-piridin boronik asit kullanarak daha ayrıntılı moleküler yolakları araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

António JP, Russo R, Carvalho CP, Cal PM, Gois PM 2019. Boronic acids as building blocks for the construction of therapeutically useful bioconjugates. Chemical Society Reviews, 48(13): 3513-3536.

Barcia C, Bahillo AS, Fernández-Villalba E, Bautista V, Poza Y Poza M, Fernández-Barreiro A, Herrero MT 2004. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. Glia, 46(4):402-409.

Barcia C, Ros CM, Annese V, Gomez A, Ros-Bernal F, Aguado-Llera D, Herrero MT 2011. IFN-γ signaling, with the synergistic contribution of TNF-α, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. Cell death & disease, 2(4):e142.

Bretaud S, Allen C, Ingham PW, Bandmann O 2007. p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. Journal of neurochemistry, 100(6): 1626-1635.

Cao J, Jiang L, Zhang X, Yao X, Geng C, Xue X, Zhong L 2008. Boric acid inhibits LPS-induced TNF-α formation through a thiol-dependent mechanism in THP-1 cells. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 22(3):189-195.

Coban FK, Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Hazman O 2015. Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. Drug and Chemical Toxicology 38(4): 391–99.

Czlonkowska A., Kohutnicka M, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A 1996. Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. Neurodegeneration, 5(2):137–143.

Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J 2004. Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. Journal of neurochemistry, 89(4): 822-833.

Goossens V, Grooten J, Devos K, Fiers W 1995. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92(18): 8115–8119.

Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE 1999. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Biochem. Soc.,Symp 66:85–97. Portland Press Limited.

Hansen MM, Jolly RA, Linder RJ 2015. Boronic Acids and Derivatives Probing the Structure–Activity Relationships for Mutagenicity. Organic Process Research & Development, 19(11):1507-1516.

Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, Czlonkowska A 1998. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Immunopharmacology 39(3):167–180.

Krüger R, Hardt C, Tschentscher F, Jäckel S, Kuhn W, Müller T, Fuchs GA 2000. Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. Journal of neural transmission, 107(5): 553-562.

Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Czlonkowska A 1999. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. Exp. Neurol. 156(1):50–61.

Kurokawa T, Katai N, Shibuki H, Kuroiwa S, Kurimoto Y 1999. BDNF diminishes caspase-2 but not c-Jun immunoreactivity of neurons in retinal ganglion cell layer after transient ischemia. Invest Ophthalmol Vis Sci 40(12): 3006–3011.

Liu B and Hong JS 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. J. Pharmacol. Exp. Ther., 304(1): 1–7.

Livak KJ, and Schmittgen TD 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods, 25(4):402-408.

Lu CJ, Hu J, Wang Z, Xie S, Pan T, Huang L, Li X 2018. Discovery of boron-containing compounds as Aβ aggregation inhibitors and antioxidants for the treatment of Alzheimer's disease. MedChemComm, 9(11): 1862-1870.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. Neurology, 38(8):1285-1285.

McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D 2003. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine administration. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 54(5):599-604.

Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T 1994. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. Neurosci. Lett. 165(1-2):208–210.

Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Park DS 2007. Involvement of interferon-γ in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. Journal of Neuroscience, 27(12): 3328-3337.

Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A 2000. Cytokines in Parkinson's disease. J. Neural. Transm. Suppl., 58:143–151.

Unal I, Emekli-Alturfan E 2019. Fishing for Parkinson's Disease: A review of the literature. J Clin Neurosci., 62:1-6

Westerfield M 1995. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish. University of Oregon Press, Eugene, OR

Yahsi Y, Gungor E, and Kara H 2015. Chlorometallate-pyridinium boronic acid salts for crystal engineering: synthesis of one-, two-, and three-dimensional hydrogen bond networks. Crystal Growth & Design. 15:2652−2660.

# Gestasyonel diyabet modeli olarak zebra balığı embriyoları

Gül Kaplan[1*], İsmail Ünal[1], Ünsal Veli Üstündağ[2], Ebru Emekli-Alturfan[1]

[*1] Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri ABD, İstanbul, Türkiye
[2]Istanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, İstanbul, Türkiye

glkapln@gmail.com

## Özet

Gestasyonel diyabet (GDM), hipergliseminin ilk kez gebelik sürecinde saptanması durumudur. Gebelik süresince görülen hafif hiperglisemi gestasyonel diyabet olarak adlandırılırken, şiddetli hiperglisemi gebelik hiperglisemisi olarak adlandırılır. Genellikle gebeliğin ikinci ve üçüncü trimesterında görülmekle birlikte herhangi bir döneminde görülebilir. GDM semptomlarını gebeliğin kendi semptomlarından ayırt etmek mümkün olmayabilir. Teşhis için oral glukoz tolerans testi uygulanmaktadır. Zebra balıkları ve embriyoları son yıllarda kullanımı yaygınlaşan model organizmalardır. Zebra balıklarında embriyolar eksternal fertilizasyonla oluşur ve embriyo gelişim evrelerini dış ortamda tamamlar. Bu nedenle zebra balığı embriyosu özellikle gelişim biyolojisi ile ilgili çalışmalarda kullanışlı modeller olarak değerlendirilmektedir. Diyabet çalışmalarında model organizma olarak zebra balığı kullanımının birçok avantajı olduğu bildirilmiştir. Bunlardan en önemlisi zebra balığı glukoz metabolizmasının, reaktif metabolit üretme yolaklarının ve bazı fizyolojik ve patofizyolojik yolaklarının insanla ve diğer memelilerle büyük oranda benzer olmasıdır. Ayrıca, insanlarda hiperglisemi kaynaklı patolojik değişimlerin zebra balıklarında da görüldüğü bilinmektedir. Tüm bunlarla birlikte, zebra balığında yapılan çalışmaların büyük bir kısmı insan çalışmalarına tercüme edilebilmektedir. İnsanlarda glikozun in-utero maruziyetini doğru bir şekilde yeniden gözlemlememize olanak sağlayacak güvenilir hayvan modelleri bulunmamaktadır. Zebra balığı embriyoları ise eksternal fertilizasyon ile oluştukları ve anneden bağımsız dış ortamada embriyonel gelişimlerini tamamladıkları için doğrudan glukoza maruz kalma sonucu gestasyonel diyabet modeli geliştirilebilir. Bu amaçla çalışmamızda zebra balığı embriyolarını beş gün boyunca glukoz çözeltilerine maruz bırakarak embriyo gelişimini izledik ve glukoz konsantrasyonlarını ölçtük. Kontrol grupları ile kıyasladığımızda glukoz çözeltilerine maruziyetin embriyoda glukoz konsantrasyonlarında artışa neden olduğunu ve bazı gelişimsel anomalilere neden olduğunu saptadık.

**Anahtar Kelimeler:** Gestasyonel diyabet, Glukoz, Zebra balığı embriyosu

# Zebrafish embryos as a model of gestational diabetes

## Abstract

Gestational diabetes (GDM) is the first hyperglycemia detected during pregnancy. Mild hyperglycemia during pregnancy is called gestational diabetes, while severe hyperglycemia is called pregnancy hyperglycemia. Although it is usually seen in the second and third trimesters of pregnancy, it can be seen in any period. It may not be possible to differentiate GDM symptoms from pregnancy's own symptoms. For diagnosis, oral glucose tolerance test is applied. Zebra fish and embryos are model organisms that have become widespread in recent years. In zebrafish, embryos are formed by external fertilization and complete the embryo development stages externally. Therefore, the zebrafish embryo is considered as useful models especially in studies related to developmental biology. It has been reported that the use of zebrafish as a model organism in diabetes studies has many advantages. The most important of these is that zebrafish glucose metabolism, reactive metabolite pathways and some physiological and pathophysiological pathways are largely similar to humans and other mammals. In addition, it is known that pathological changes due to hyperglycemia occur in zebrafish in humans. However, most of the work done in zebrafish can be translated into human studies. There are no

reliable animal models that will allow us to accurately re-observe in-utero exposure of glucose in humans. Gestational diabetes model can be developed as a result of direct glucose exposure since zebrafish embryos are formed by external fertilization and complement their embryonic development independent of the mother. For this purpose, in our study, we exposed the zebrafish embryos to glucose solutions for five days, followed the development of the embryo and measured the glucose concentrations. When compared with the control groups, we found that exposure to glucose solutions caused an increase in glucose concentrations and some developmental anomalies in zebrafish embryos.

**Keywords**: Gestational diabetes, Glucose, Zebrafish embryo

## GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), gebelikte en sık rastlanan tıbbi komplikasyondur (Mihmanlı ve Mihmanlı 2015). Gestasyonel diabetes mellitus (GDM), hem dünyada hem de Türkiye' de gebelikte başlayan ya da ilk tanısı gebelik sırasında konulan glukoz intoleransıyla karakterize küresel bir halk sağlığı sorunudur (Mishra ve ark., 2018). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)' nun 2019 verilerine göre GDM prevalansı, Türkiye'de %17.8' dir ve bu sıklığın gittikçe artacağı düşünülmektedir. GDM; Uluslararası Diyabetik Gebelik Çalışma Grupları Birliği (IADPSG), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Amerikan Diyabet Derneği (ADA) gibi örgütlerce gestasyonel ve pre-gestasyonel diyabet adı altında iki ayrı başlıkta toplanmıştır. Pre-gestasyonel veya gestasyonel DM, gebelik öncesinde teşhis edilen ve insülin direncinin daha az olduğu gebeliğin erken döneminde (ilk 8 haftasında) kan glukozunun kontrol altında olmadığı standart gebelik dışı kriterlerle tanınan diyabettir. Ilk 8 haftada organlar oluştuğu için kan glukozunun yüksek olması organogenez sırasında problemlere neden olabilir. Gebelikte görülme sıklığı %10' dur. GDM ise ilk kez gebelikte teşhis edilen ve insülin direnciyle karakterize diyabete denilmiştir. Glukoz kontrolündeki problem gebelikten kaynaklanır. Genelde 2.trimestırda ortaya çıkar. Bu sürede organogenez çoktan bitmiştir. Bu nedenle düşük ve anomali riski yoktur ama kan glukozunun yüksek olması fetüse zarar verir. Gebeliğe bağlı diyabet görülme sıklığı % 90'dır. GDM'de yeterli glisemik kontrol sağlanmazsa fetüste ve annede birçok probleme neden olabilir. Yenidoğan, adölesan ve erişkinlik çağlarını etkileyebilir (Öztürk ve Altuntaş, 2015). İngiliz araştırmacı Barker 'Fetal Orijinler' hipotezinde gebelikte rahim içi ortamın; annenin fizyolojik, metabolik, psikolojik ve sosyolojik durumundan etkilenebildiğini ve bu durumun fetüste yapısal, fizyolojik ve metabolik olarak kalıcı değişikliklere sebep olabileceğini göstermiştir. Gelişim aşamaları etkilenen fetüste erişkinlik döneminde; obezite, diyabet, hipertansiyon ve dislipidemi gibi bulaşıcı olmayan kronik hastalıkların görülebileceği bildirilmiştir (Erbay ve ark., 2019). Bu süreçte gebelik boyunca artan insülin direnci sonucunda maternal glisemiyi istenilen aralıkta tutmak için pankreastan salgılanan insülin miktarı gebe olmayanlara göre iki kattan fazla artar. Normal gebelerde bu durum fizyolojik olarak tolere edilebilirken diyabetli kadınlarda ve daha önce diyabetli olduğu bilinmeyen birçok kadında gebelik sırasında kompanse edilemez ve karbonhidrat metabolizmasının dengesi bozulur. Gebelik tipik olarak, açlık hipoglisemisi, tokluk hiperglisemisi ve hiperinsülinemi ile karakterizedir. Beta hücre disfonksiyonu ve erken faz insülin yanıtındaki bozulma sonucunda postprandiyal hiperglisemi gelişirken, hepatik glukoz üretiminin baskılanamaması açlık hiperglisemisiyle sonuçlanır. Maternal insülin plasentadan geçemediğinden fetüs hiperglisemiye maruz kalır. Sonuçta, anne ve fetüste hiperglisemi gelişir. Bu durum özellikle tekrarlayan postprandiyal hiperglisemi atakları ile kendini gösterir. Fetal hiperglisemi, fetal hiperinsülinemiye ve insülinin anabolik etkileri sonucunda fetal adipozitede artış görülür (Taşpınar 2006).

İlk olarak 1972' de Oregon Üniversitesi'nde George Streisinger tarafından çalışmalarda kullanılan Asya ülkelerinin tatlı sularında yaşayan zebra balıkları; diyabet, kanser gibi birçok hastalığın modellenmesinde kullanıldı (Lessman C 2011). Latince ismi Danio rerio olan zebra balıklarının hastalık modellerinde kullanılmalarının birçok nedeni vardır. İlk olarak insanlar ve zebra balıkları arasında yaklaşık % 73 oranında gen ortolojisi olması çalışmalarda kullanımını yaygınlaştırmıştır (Howe ve ark., 2013). Ayrıca embriyolojik gelişimlerinin hızlı (yaklaşık 2-3 ayda erişkin olabilmeleri) olması, insanlar ile benzer organegenez süreçlerine sahip olmaları, genetik olarak izlenebilir olmaları, eksternal fertilizasyon ve gelişim süreçleri nedeniyle

eşleşmeleri dahil embriyo eldesi ve sonraki tüm aşamaların izlenebilir olması, diğer vertabralılara göre kolay ve hızlı fertilizasyon süreçlerine sahip olmaları, bir dişiden haftada yaklaşık 200 yumurta elde edilebilmesi, optik olarak şeffaf ve dayanıklı oluşları, beslenmelerinin ve barınmalarının ucuz olması birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmalarını sağlamıştır ( D'Costa ve Shepherd 2009; Garcia ve ark., 2016; Tavares ve ark., 2013).

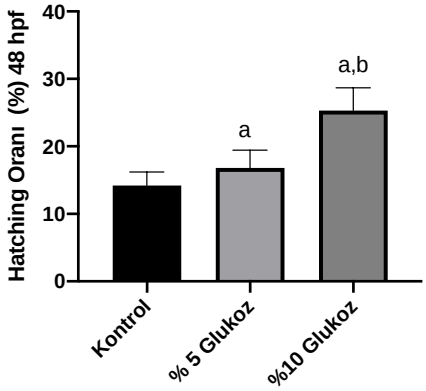
Çalışmamızın amacı; zebra balığı embriyolarını glukoza maruz bırakmak suretiyle fetal hiperglisemi modeli oluşturmak ve bu glukoz maruziyetinin zebra balıklarının embriyonel gelişim süreçlerine ve glukoz konsantrasyonlarına etkilerini incelemektir.

## MATERYAL VE METOT

2 dişi 1 erkek zebra balıklarının eşleştirilmesiyle embriyolar elde edildi. % 5 ve % 10 glukoz çözeltileri ve kontrol için embriyo medium çözeltileri hazırlandı. Embriyolar eşit sayıda olacak şekilde 3 gruba ayrıldı ve 3 gün boyunca kontrol embriyo mediuma diğer gruplar ise % 5 ve % 10 oranlarında glukoz çözeltisine maruz bırakıldı. Embriyoların çözeltileri 24 saatte bir yenilendi. Hatching (koryondan çıkma) ve ölüm-kalım sayımı yapıldı. Her gün malformasyon takibi için fotoğrafları çekildi. 3. günde embriyolar homojenizasyon protokolüne uygun olarak 3 dk 50 Osc' de homojenize edildi. Süpernatant elde edebilmek için 2 dk 14.000 rpm' de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttaki glukoz düzeyleri, glukoz oksidaz yöntemi ile 500 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlendi.

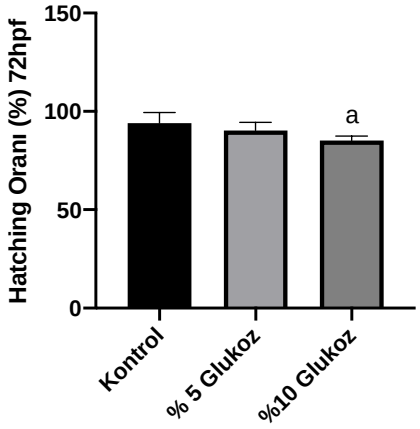
## BULGULAR- TARTIŞMA

Zebra balıkları gelişimsel olarak fertilizasyon sonrası 48.ve 72. saatlerde koryondan çıkış (hatching) yapmaya başlar. Çalışmamızda fertilizasyon sonrası 48.saatte hatching oranları kıyaslandığında % 5 glukoz grubunda hatching oranının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını belirledik. %10 glukoz grubunda ise hatching oranının hem kontrol hem de % 5 glukoz grubuna göre anlamlı derecede arttığını gözlemledik. Fertilizasyon sonrası 48.saat hatching oranlarının karşılaştırılması Şekil 1'de verilmiştir.



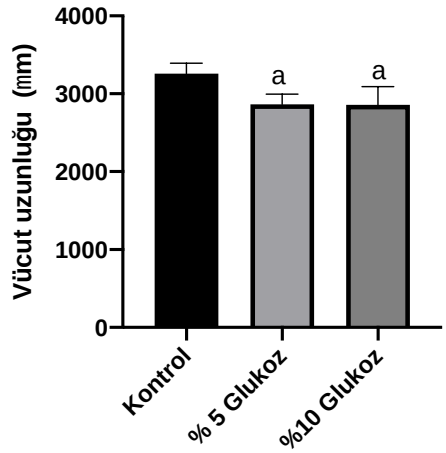

**Şekil 1:** Kontrol, % 5 Glukoz ve % 10 Glukoz uygulanan gruplarda fertilizasyon sonra 48.saatte (48 hpf) hatching (kuluçkadan çıkma) oranlarının karşılaştırılması. Değerler ortalama ± standart olarak verilmiştir. [a] $p<0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı [b] $p<0,05$ % 5 Glukoz grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

Fertilizasyon sonrası 72.saatteki hatching oranlarının karşılaştırılması Şekil 2'de verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında % 10 glukoz grubunda hatching oranının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını belirledik. %5 glukoz grubu ile kontrol grubu ve %10 glukoz grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



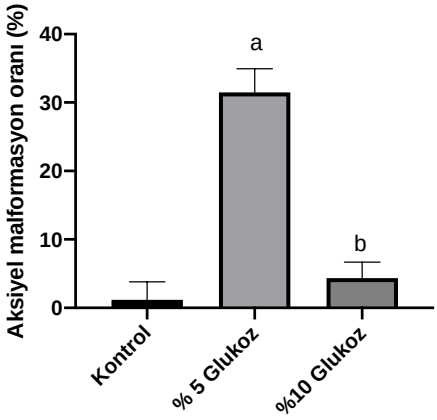

**Şekil 2:** Kontrol, % 5 Glukoz ve % 10 Glukoz uygulanan gruplarda fertilizasyon sonra 72.saatte (72 hpf) hatching (kuluçkadan çıkma) oranları Değerler ortalama ± standart olarak verilmiştir. [a] $p<0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

ZFIN zebra balığı gelişimsel evreleme serisine göre zebra balığı embriyosunun 72. saatteki ortalama boy uzunluğu 3.5 mm olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kontrol grubundaki embriyolar beklenen boy uzunluğuna ulaşmasına rağmen %5 ve %10 oranlarında glukoza maruz bırakılan grupların boy uzunluğunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ($p <0,05$). Embriyoların fertilizasyon sonrası 72. saat vücut uzunlukları karşılaştırılması Şekil 3'de verilmiştir.



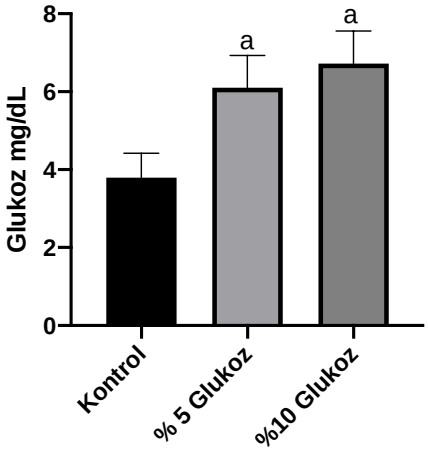

**Şekil 3:** Kontrol, % 5 Glukoz ve % 10 Glukoz uygulanan gruplardaki embriyolarda fertilizasyon sonrası 72. Saatte (72 hpf) uzunluklar (µm). Değerler ortalama ± standart olarak verilmiştir. [a] $p<0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

Fertilizasyon sonrası 72. saatteki aksiyel malformasyon oranları kontrol grubu ve glukoz maruziyeti gruplarında kıyaslandı ve aksiyel malformasyon oranının % 5 glukoz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını gözlemledik. % 10 glukoz grubunda ise % 5 glukoz grubuna göre anlamlı derecede bir azalma tespit ettik. Grupların malformasyon oranlarının karşılaştırılması Şekil 4'te verilmiştir.




**Şekil 4:** Kontrol, % 5 Glukoz ve % 10 Glukoz uygulanan gruplarda 72.saatte (72 hpf) belirlenen aksiyel malformasyon oranları. Değerler ortalama ± standart olarak verilmiştir. [a] $p<0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı, [b] $p<0,05$ % 5 Glukoz grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

Çalışmamızda kontrol ve glukoz maruziyeti gruplarının glukoz konsantrasyonlarının karşılaştırılması Şekil 5'te verilmiştir. Referans aldığımız makalede % 4 ve % 5 glukoz maruziyeti sonucunda fertilizasyon sonrası 5. günde (5 dpf) embriyoların glukoz düzeylerinde dalgalanmalar gözlenmiş ve 30 mg/dL'ye varan glukoz düzeyleri bildirilmiştir (Singh ve ark.'nın 2019). Kontrol grubu embriyolarındaki glukoz düzeyi 3,86 mg/dL olan referans çalışma ile çalışmamızın kontrol grubu sonuçları benzerdir. Şekil 5' de kontrol grubuna göre kıyaslanan %5 ve %10luk glukoz grubu embriyolarının glukoz düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Çalışmamızda glukoz maruziyeti ile kontrol grubumuza göre anlamlı artışlar elde edilmekle beraber Singh ve ark.'nın maruziyet gruplarının glukoz düzeylerinden düşüktür. Bu durum glukoz tayin yöntemlerimizin farklılığına bağlı olabilir.




**Şekil 5:** Kontrol, % 5 Glukoz ve % 10 Glukoz uygulanan gruplardaki glukoz değerleri (mg/dL). Değerler ortalama ± standart olarak verilmiştir. [a] $p<0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

## SONUÇ

Preeklemsi, fetal makrozomi ve fetal ölüm de dahil olmak üzere hem anne hem de fetüste birçok sağlık komplikasyonuyla bağlantılı olan GDM'nin, bu akut komplikasyonlarına ek olarak, fetal hiperglisemi maruziyetinin fetüsün ileriki yaşlarında hastalık riskini artırabileceği çalışmalarda gösterilmiştir. GDM'li annelerin çocukları obezite, tip 2 diyabet, hipertansiyon ve metabolik sendroma daha duyarlıdır (Demir 2011). Glukoz serbestçe plasentadan fetal dolaşıma geçebildiğinden maternal glisemiyi manüple ederek hayvanlarda gebelik diyabeti modeli araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmıştır (Blue ve ark., 2015). Yapılan

çalışmaların çoğunda pre-gestasyonel diyabet modeli kullanılmışken biz çalışmamızda gestasyonel diyabet modeli oluşturmayı hedefledik ve fetal hipergliseminin zebra balığı embriyolarındaki etkilerini gözlemledik. Çalışmamızda fetal hiperglisemi modelini zebra balığı embriyolarında modellemek diğer vertebralılara göre daha hızlı ve avantajlıydı. Bilimsel amaçlarla kullanılan hayvanların korunmasına ilişkin 2010/63 / EU sayılı AB Yönergesine göre, erken yaşam evrelerindeki zebra balığı embriyoları, bağımsız beslenme yeteneğine (döllenmeden 5 gün sonra) ulaşana kadar deney hayvanlarına alternatif modeller olarak kabul edilmektedirler. Glukoz molekülünün çapı (1-1.5 nm) zebra balığı embriyo koryonundan (0.6-0.7 μm) geçebilecek büyüklüktedir (Kim ve Tanguay 2014). Zebra balığı embriyoları şeffaf olduğundan çalışmanın her aşamasında embriyoların stereo mikroskobuyla gözlemlenebilmesi anlık olarak embriyodaki malformasyonları takip edebilmemizi sağlamıştır. Uygulanan glukozu kitlerle kısa sürede ölçebilmek diğer kemirgen modellerine göre daha hızlı sonuç almamızı sağlamıştır (Zang ve ark., 2018). GDM'de hayvan modeli olarak hem zebra balığı kullanımı hem de zebra balığı embriyolarının kullanımıyla ilgili daha fazla sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır. Embriyoda hiperglisemiye neden olabilecek ajanlar ile ilgili araştırmalarımız devam etmektedir.

## KAYNAKLAR

Singh A, Castillo H, Brown J, Kaslin J, Dwyer K, Gibert Y 2019. High glucose levels affect retinal patterning during zebrafish embryogenesis, Nature- Scientific Reports, 9:4121.

D'Costa A, Shepherd I 2009. Zebrafish development and genetics: ıntroducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large ıntroductory laboratory class. Zebrafish Georgia University, 6:2.

Tavares B, Santos Lopes S 2013. The importance of zebrafish in biomedical research. Acta Medica Portuguesa 26(5):583-92.

Taşpınar B 2006. Pre-gestasyonel ve gestasyonel diabetes mellitusda takip-tedavi protokollerimiz ve maternal-perinatal sonuçları(uzmanlık tezi). T.C.Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi.

Lessman C 2011. The developing zebrafish (Danio rerio): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. Birth Defects Research Part C: Embryo Today, 93(3):268-80.

Blue E, Ballman K, Boyle F, Oh E, Kono T, Quinney S, Thurmond D, Evans-Molina C, Haneline L 2015. Fetal hyperglycemia and a high fat diet contribute to aberrant glucose tolerance and hematopoiesis in adulthood. Pediatric Research, 77(2): 316–325.

Erbay E, Topal S, Altınkaynak S 2019. Yaşama sağlıklı başlamanın basamakları. Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi, 22(1): 64-70.

Öztürk F, Altuntaş Y 2015. Gestasyonel diabetes mellitus. Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Haber Bülteni, Sayı:49(1), 1-10.

Garcia G, Noyes P, Tanguay R 2016. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. Pharmacology & Therapeutics, 161:11-21.

Demir H 2011. Erişkin dönemdeki hastalıkların fetal programlanması: Beslenmenin rolü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 54: 45-50.

Howe K, Clark M, et. all 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 496: 498–503.

Kim K, Tanguay R 2014. The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryonic zebrafish assay. Environmental Health Toxicology, 29.

Zang L, Maddison L, Chen W 2018. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. Front Cell Develope Biology, 6: 91.

Dırectıve 2010/63/Eu Of The European Parlıament And Of The Councıl. Ulaşılabilir: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF [06.04.2020]

Mishra S, Bhadoria S, Kishore S, Kumar R 2018. Gestational diabetes mellitus 2018 guidelines: An update. Journal of Family Medicine and Primary Care, 7(6): 1169–1172.

Mihmanlı V, Mihmanlı M 2015. Diyabetes mellitus ve gebelik. Okmeydanı tıp dergisi 31(ek sayı):17-22.

Bionumber. Ulaşılabilir: https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?id=106979 [06.04.2020]

International Diabetes Atlas 2019. https://diabetesatlas.org/data/en/country/203/tr.html [05.04.2020]

Zebrafish Book: Growing Zebrafish Ulaşılabilir: https://zfin.org/zf_info/zfbook/chapt3/3.2.html [06.04.2020]

Zebrafish Developmental Staging Series. Ulaşılabilir:https://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/ [06.04.2020]

# Diagnostik röntgen maruziyetinin zebra balığı embriyosu üzerine etkileri

Atakan Karagöz*[1], Mümine Beler[1], Fümet Duygu Üstündağ[2], Şebnem Erçalık Yalçınkaya[3], Ebru Emekli-Alturfan[1]

*[1] Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri ABD, Istanbul, Türkiye
[2] Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik ABD, Istanbul, Türkiye
[3]Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi ABD, Istanbul, Türkiye

atakan.karagoz@hotmail.com

## Özet

Diagnostik röntgenler diş hekimliğinin önemli bir parçasıdır. Radyasyon dozları dijital tekniklerin gelişmesi nedeniyle azaltılmış olsa da, dental diagnostik X-ray görüntüleme oral muayene için dental kliniklerde sıkça uygulanan en yaygın radyolojik prosedür tiplerinden biri olmaya devam etmektedir. Diş etleri, tam ağız serileri ve panoramik görüntüler dahil olmak üzere belirli muayene türleri için dental diagnostik röntgenler yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaşam boyu röntgene maruz kalma sıklığı göz önüne alındığında, bu durumun oluşturabileceği risk halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Dental röntgen cihazları hastaları nispeten düşük radyasyon dozlarına maruz bırakır. Bununla birlikte, düşük dozda radyasyon nedeniyle artan kanser riskine dair önemli kanıtlar da literatürde bulunmaktadır. Özellikle tekrarlanan maruz kalma durumu kanser riskini artırabilir. Dental röntgen ışınlarına maruz kalmanın neden olabileceği kanser risk potansiyelini gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur. Radyasyona embriyonel dönemde maruziyet özellikle gelişimsel anomali riskleri açısından önem taşımaktadır. Zebra balıkları ve embriyoları son yıllarda kullanımı yaygınlaşan model organizmalardır. Zebra balıklarında embriyolar eksternal fertilizasyonla oluşur ve embriyo gelişim evrelerini dış ortamda tamamlar. Bu nedenle zebra balığı embriyosu özellikle gelişim biyolojisi ile ilgili çalışmalarda kullanışlı modeller olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda zebra balığı embriyoları iki farklı röntgen cihazından kaynaklanan radyasyona maruz bırakılmış ve gelişimleri ile oksidatif stres parametreleri incelenmiştir. Çalışmamız sonucunda panaromik röntgen cihazlarından kaynaklanan radyasyonun zebra balıklarının gelişimini etkilediği ve gluttayon S-transferaz aktivitesinde değişikliğe neden olduğu bulunmuştur. Çalışmamızın bulguları röntgen cihazları kaynaklı radyasyon maruziyetinin embriyonel dönemde potansiyel zararlı etkilerini gösteren öncül nitelikte veriler sunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Diş hekimliği, Diagnostik röntgenler, Zebra balığı embriyosu, Oksidatif stres

## GİRİŞ

Tıbbi görüntüleme işlemleri hastalığın teşhisi ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesi için gereklidir. Diagnostik röntgenler diş hekimliğinde diş çürümesini, kemiklerdeki enfeksiyonları, kök patolojilerini ve diğer birçok diş sorununu tanımlamak için dental ve maksillofasiyal yapıların görüntülenmesinde etkili bir araçtır. Ancak düşük dozlara ve geliştirilmiş teknolojilerin kullanılmasına rağmen, hala diş röntgenine maruz kalma ile ilişkili sağlık risklerinin arttığına dair kamuoyu algısı devam etmektedir.

Radyasyonun insan dokuları veya diğer maddelere verdiği hasar mekanizmaları maddedeki atomların iyonizasyonu ile olur. Dokular tarafından absorplanan radyasyon dokudaki elektronları uzaklastırmak için yeterli enerjiye sahipse iyonizasyon meydana gelir. Böyle enerjiye iyonizan radyasyon denir. Radyoterapi ve tanısal radyasyon iyonizan radyasyondur ve en sık kullanılan radyasyon tipi X ve gama ışınlarıdır. (Toplan S., 2020)

Dental tanısal radyografilerde kullanılan iyonlaştırıcı radyasyon dozları sürekli azalmıştır. Dijital radyografi sistemlerinin kullanıma girmesiyle doz miktarları günümüzdeki minimum seviyelere inmiştir. Geleneksel filmlerle alınan periapikal radyografiler yaklaşık 1.5 µSv doz kullanılarak alınmaktadır. Tüm ağız taramalarında 10-12 film kullanılmaktadır. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nun (TAEK) periapikal radyografiler için kabul ettiği güvenlik sınırı ise saatte 20 µSv'tir. Hastalar için izin verilen maksimum yıllık tıbbi tetkik dozu ise 1 miliSievert (mSv)'dir. Diş hekimlerinin en sık kullandığı yöntem olan panoramik radyografi için doz 0,008-0,024 mSv'dir. (Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, 2017)

Glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptid olan Glutatyon (y glutamil sisteinil glisin) ilk defa 1888'de izole edilmiş olmasına rağmen yapısı 40 sene sonra açıklanmıştır. Glutatyon kısaltmasında kullanılan GSH'da SH sisteinin sülfidril grubuna işaret eder vemolekülün alışveriş yapan kısmıdır. Glutatyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonunu katalizleyen enzimlere "glutatyon -S- transferazlar" kısaca "GST" denir. Vertabralılarda yedi sınıf sitoplazmik GST tespit edilmiştir: alfa, mü, kappa, pi, sigma, theta ve zeta. Sitoplazmik GST (cGST)'lar iki aynı alt üniteden (homodimerler) veya farklı alt üniteden (heterodimerlerden) oluşmuşlardır. GST'lar her bir alt birim için katalitik bölgeye sahip globular dimerik proteinlerdir. 23.000-29.000 dalton moleküler ağırlığındadır. Her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur (Allocati ve ark. 2018).

Zebra balığı (Danio rerio), Güney Asya'ya özgü, sazangiller ailesine ait bir tatlı su balığıdır. Zebra balıkları son yıllarda gelişim biyolojisi ve genetik araştırmalarda, klinik öncesi ilaç geliştirmede ve ilgili bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir omurgalı model organizmadır. Rejenerasyon yetenekleri ile dikkat çekmektedirler ve araştırmalarda kullanmak üzere birçok transgenik suş üretilmiştir. Zebra balığı embriyoları şeffaf olmaları, eksternal fertilizasyon ile oluşmaları ve hızlı embriyogenez süreçlerinden dolayı toksikolojik araştırmalarda yaygın olarak tercih edilir hale gelmişlerdir.

Çalışmamızın amacı, zebra balığı embriyolarını iki farklı röntgen cihazından kaynaklanan radyasyona maruz bırakılarak bu embriyoların gelişimlerini ve GST aktivitelerinin incelenmesidir.

## MATERYAL ve METOD

Yabani tip AB / AB türü zebra balıkları, hastalık içermeyen koşullarda barındırıldı. Balıklar, akvaryum raf sisteminde (Zebtec, Tecniplast, İtalya) 14/10 saatlik aydınlık / karanlık döngüsü altında 27 ± 1 ° C'de tutuldu ve günde iki kez canlı Artemia ilavesi ile beraber ticari pul balık yemi ile beslendi. Tüm deneyler için 0.018 mg L-1 Instant Ocean ™ tuzu içeren ters ozmoz suyu kullanıldı. Doğal yumurtlamalardan sonra, döllenmiş embriyolar daha önce tarif edildiği gibi gelişim ve morfolojilerine göre toplandı ve evrelendi (Westerfield 1995).

### Embriyo maruziyeti

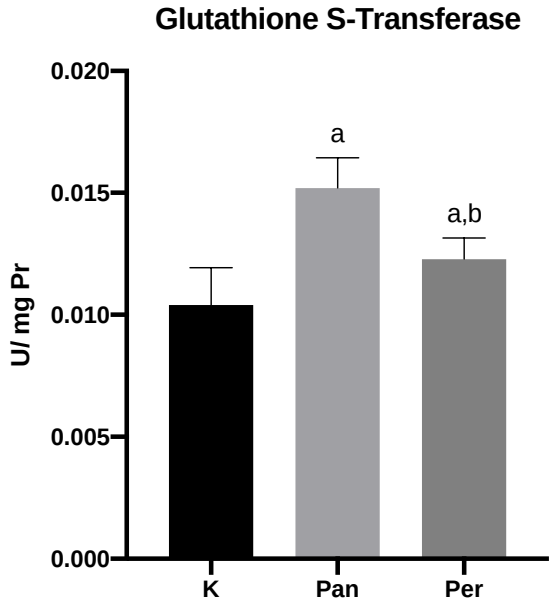
Çalışmamızda zebra balığı embriyoları, 1 grup kontrol grubu olmak üzere 3 gruba ayrılmış, diğer 2 grup da panoramik (Morita, VeraView IC5, J. Morita MFG. Corp., Kyoto, Japan, 70kV, 7,5mA) ve periapikal (New Life, Evolution X3000 2C/1, Grugliasco,Italy, 70kV, 8mA) cihazları olmak üzere iki farklı röntgen cihazından kaynaklanan radyasyona maruz bırakılmıştır.

1 grup kontrol grubu olmak üzere 3 gruba ayrılmış, diğer 2 grup da panoramik ve periapikal cihazlar olmak üzere iki farklı grup oluşturulmuştur. Her bir gruptan 2 tekrar grubu oluşturulmuştur.

Maruziyetler 24 hpf'de bir defa gerçekleştirilmiş ve deney süresi sonunda 96 hpf'deki embriyolar homojenize edilmiştir. Embriyolardan elde edilen homonenatlarda GST (Glutatyon-S-Transeferaz) aktivitesi ölçüldü. GST aktivitesi, glutatyon (GSH) ve 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır (Habig ve Jacoby, 1981).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçlarına göre GST aktivitesi hem panaromik hem de periapikal röntgen cihazlarına maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Ayrıca panaromik röntgen cihazına maruz bırakılan grupta GST aktivitesi periapikal röntgen cihazına maruz bırakılan gruba göre anlamlı derecede artmıştır (Şekil 1).




**Şekil 1:** Kontrol, Panaromik ve Periapikal Röntgen Cihazlarına maruz kalan gruplarda GST aktiviteleri

[a] Kontrol grubundan anlamlı derecede farklı, $p<0,05$

[b] Panaromik gruptan anlamlı derecede farklı, $p<0,05$

GST enzim sistemleri birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda önemli rol oynayan Faz II metabolizması enzimlerindendir. Ksenobiyotik metabolizmasında indirgenmiş glutatyonun (γ-L-glutamil-L-sisteinil-glisin, GSH) rolü; faz I enzimlerince oluşturulan reaktif türlerin GSH ile konjugasyona girmesi ve sonuçta hücre makromolekülleri (DNA, RNA, protein) ile bağlanmasını engelleyerek hücre hasarını önlemesi şeklinde gerçekleşmektedir. Ksenobiyotiğin reaktif türleri, proteinlere bağlanıp onları değişikliğe uğratıp antijenik özelliğini değiştirebilir. Ksenobiyotik bir hapten yani tek başına antikor sentezini uyarmayan bir molekül gibi davranıp, antikorla birleşip hücreyi hasara götürebilir. GST'ler elektrofilik ksenobiyotikleri inaktive ederek vücuttan atılmak üzere konjugasyonunu sağlayan dimerik enzimlerdir. GST'ler doğada bakteriler, maya, küf, yumuşakçalar, kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memelilerde bulunur. En sık rastlandığı dokular, başta karaciğer olmak üzere, incebağırsak, kalınbağırsak, böbrek, akciğer, meme, kas, dalak, testis ve plasentadır. GST'ler membrana bağlı ve sitoplazmik olmak üzere iki grupta incelenmektedirler (Allocati ve ark. 2018).

GST'ler, oksidatif strese ve çeşitli toksik moleküllere karşı hücre koruması da dahil olmak üzere çoklu biyolojik role sahiptirler; lökotrienlerin ve prostaglandinlerin sentezinde ve modifikasyonunda yer alırlar. Örnek olarak, GST'ler, DNA'yı mutasyonları ve karsinogenezi indükleyen DNA hasarına neden olabilecek oksidatif hasara karşı korur. GSH'ı birçok karsinojen, ilaç ve oksidatif metabolizma ürünü ile konjüge edebilir, bu da onları daha az toksik ve hücreden atılabilir hale getirir (Hayes ve ark., 2005).

Düşük dozlarda iyonlaştırıcı radyasyonların biyolojik sistemlere etkisi önemli bir tartışma konusu olmuş; moleküler temeli şimdiye kadar iyi anlaşılmamıştır. Deneysel çalışmalar, düşük dozda X-ışınlarının, lenfositler, makrofajlar ve sitokinlerin aktivitelerini düzenleyerek bağışıklık sistemini aktive edebileceğini göstermiştir. Farelerde düşük doz iyonlaştırıcı radyasyonlara maruz kalmanın, bazı büyüme faktörlerini ve DNA ve hücresel onarım mekanizmalarını geliştirme potansiyeli olduğu da bildirilmiştir (Sharma ve ark., 2019). Bununla beraber, çeşitli kanser türlerinde, GST'lerin, konjügasyon aktiviteleri ile bazı antikanser ilaçlarına karşı gelişen dirençte rol aldığı gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde, GST'ler normal hücrelere kıyasla

sıklıkla yüksek ekspresyon seviyeleri gösterir. GST'lerin aşırı ekspresyonu, antikanser ilaçların detoksifikasyonunun artmasına katkıda bulunabilir (Gate ve Tew, 2001).

Diş radyografisi dahil diğer düşük X-ışını dozlarından insanlarda tüm kanser ve mutasyon risklerinin değerlendirilmesi gerekir. Bu nedenle, düşük doz radyasyonun yarattığı risklerin bazı sorunlara yol açabildiği bilinmelidir.

Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda artan GST aktiviteleri, diagnostik X-ray cihazlara maruziyetin tetiklediği oksidatif hasara bağlı savunma sistemlerinin aktivasyonu ile ilişkilendirilebilir. Konu ile ilgili çalışmalarımıza panaromik ve periapikal cihazların etkilerinin karşılaştırılması ve diğer metabolik yolakların incelenmesi şeklinde devam etmekteyiz.

**KAYNAKLAR**

Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C. et al. Glutathione transferases: substrates, inihibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. Oncogenesis 7, 8 (2018).

Gate, L. & Tew, K. D. Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. Expert. Opin. Ther. Targets 5, 477–489 (2001).

Habig WH, Jacoby WB. Assays for differentation of glutathione-s-transferases. Methods Enzymol, 1981;77: 398-405.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U. & Jowsey, I. R. Glutathione transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 51–88 (2005).

Sharma S, Singla N, Chadha VD, Dhawan DK. A concept of radiation hormesis. Stimulation of antioxidant machinery in rats by low dose ionizing radiation. Hell J Nucl Med 2019;22(1):43-48.

Toplan S. , İyonizan Radyasyonun Biyolojik Etkileri 2020, http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/serife-selmin-toplan/011%20iyonizan%20Radyasyonun%20Biyolojik%20Etkileri-Prof.%20Dr.pdf

Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Diş Röntgen Cihazları ile Yapılan Uygulamalar için Radyasyon Güvenliği Kılavuzu, 2017

Westerfield M (1995) The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish, University of Oregon Press, Eugene, OR

# Rotenon Toksisitesi Durumunda Kaprilik Asidin Etkileri

Derya Cansız[1*], İsmail Ünal[2], Ünsal Veli Üstündağ[3], Ahmet Ata Alturfan[1], Meriç Altınöz[4], İlhan Elmacı[5], Ebru Emekli-Alturfan[1]

[1*] İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Biyokimya ABD, Istanbul, Türkiye
[2] Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri ABD, Istanbul, Türkiye
[3]Istanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Istanbul, Türkiye
[4]Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Istanbul, Türkiye
[5]Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroşirurji ABD, Istanbul, Türkiye

## Özet

Parkinson hastalığı (PH) dünya üzerinde en yaygın olarak görülen ikinci nörodejeneratif bozukluktur. PH'nin nörodegeneratif yönü farklı tipteki nöronların selektif bir şekilde ölmesi ile karakterizedir. Dopaminerjik sistem zebra balığında hem embriyonik hem de yetişkinlik döneminde iyi karakterize edilmiştir. Bu nedenden dolayı zebra balığı ve embriyosu nöronal araştırmalar için güçlü bir model olarak kabul edilmektedir. PH oluşturmak üzere en sık kullanılan kimyasallardan biri rotenondur. Rotenon rotenoid ailesinden yaygın bir kimyasaldır. Rotenonun lipofilik oluşu kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçmesini sağlar. Hücrede proteozom aktivitesini inhibe eder ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olur. Rotenona maruz bırakılan yetişkin zebra balıklarında motor fonksiyonlarının azaldığı, koku alma fonksiyonlarının bozulduğu ve dopamin seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Orta zincirli trigliserit diyetleri ketojenik diyetin bir modifikasyonu olarak geliştirilmiştir. Orta zincirli trigliseritler, gliserolün altı ila on iki karbon yağ asidi esteridir. Oldukça ketojeniktirler ve küçük boyutlarından dolayı bağırsakta serbest yağ asitlerine hidrolize edilirler ve hızla emilirler. Kaprilik asit trigliseridinin, nöronal metabolizma için alternatif bir enerji substratı olarak işlev görebildiği gösterilmiştir. Kaprilik asit, nöbet tedavisinde olumlu etkileri öne sürülen orta zincirli trigliserit diyetinin ana bileşeni olup kan-beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir. Çalışmamızda zebra balığı embriyolarında rotenon toksisitesi durumunda kaprilik asidin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın sonucunda kaprilik asidin oksidan-antioksidan parametreler üzerinde doza bağlı değişen etkileri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Parkinson Hastalığı, Kaprilik Asit, Zebra balığı

## GİRİŞ

Dünya üzerinde en yaygın olarak görülen ikinci nörodejeneratif bozukluk olan Parkinson hastalığı (PH)'nda dopaminerjik nöronların kaybı söz konusudur. Dünya üzerinde ilerleyen yaşla beraber milyonlarca kişiyi etkileyen PH oranının, yaşlı nüfusun artması ile beraber önümüzdeki yıllarda artmaya devam etmesi beklenmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sporadik geç başlangıçlı PH'nin vakaların % 90' ını oluşturduğunu, geriye kalanının ise ailesel kaynaklı erken başlangıç vakaları olduğunu göstermiştir (Lill, 2016). PH'de etkin tedavi yöntemi halen bulunamamış olup mevcut tedavi semptomların giderilmesine yöneliktir ve nöronal dejenerasyon yavaşlatılamamakta veya önlenememektedir. PH için en yaygın kullanılan tedavi seçeneği olan levodopa, dopamin replasmanı amaçlı uygulanır ancak tedavinin yararlı etkileri hastalığın ilerlemesiyle giderek azalır (Lewitt, 2008).

Kaprilik asit, sistematik adı oktanoik asit olarak da bilinen bir karboksilik asittir. Kaprilik asit (C8: 0), kaprik asit (C10: 0) ve laurik asit (C12: 0) gibi orta zincirli yağ asitleri 8 ila 12 karbon atomlu bir omurga zinciri taşır. Orta zincirli yağ asitleri süt yağı, palmiye yağları, hindistan cevizi ve tohum yağlarında orta zincirli trigliseritler şeklinde bulunurlar (Decuypere ve Dierick, 2003). Orta zincirli yağ asitlerinin, doymuş yağ asitleri olmalarına rağmen, hem fiziksel hem de metabolik olarak uzun zincirli yağ asitlerinden oldukça farklı olduğu belirtilmiştir. Kaprilik asit, süt ürünleri, bira fabrikaları, şarap imalathanelerinde ve gıda ile temas eden birimlerde yüzey dezenfektanı olarak kullanılan antimikrobiyal bir pestisittir. Ek olarak, kaprilik asit, fidanlıklar, seralar, bahçe ve iç mekanlarda bakterisit, fungisit ve herbisit olarak kullanılmaktadır. Orta zincirli

yağ asitlerinin vücut yağ birikimini azaltıp kolesterol metabolizmasını geliştirebildiği bildirilmiştir (Nosaka ve ark., 2003).

Son yıllarda kullanımı giderek yaygınlaşan Zebra balıklarında dopaminerjik sistem hem embriyonik hem de yetişkinlik döneminde iyi karakterize edilmiştir. Bu nedenden dolayı zebra balığı ve embriyosu nöronal araştırmalar için güçlü bir model olarak kabul edilmektedir. PH oluşturmak üzere en sık kullanılan kimyasallardan biri rotenondur. Rotenon rotenoid ailesinden yaygın bir kimyasaldır. Rotenonun lipofilik oluşu kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçmesini sağlar. Hücrede proteozom aktivitesini inhibe eder ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olur. Rotenona maruz bırakılan yetişkin zebra balıklarında motor fonksiyonlarının azaldığı, koku alma fonksiyonlarının bozulduğu ve dopamin seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Khatri ve Juvekar, 2016; Khotimah ve ark., 2015; Martel ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017).

Orta zincirli trigliserit diyetleri ketojenik diyetin bir modifikasyonu olarak geliştirilmiştir. Orta zincirli trigliseritler, gliserolün altı ila on iki karbon yağ asidi esteridir. Oldukça ketojeniktirler ve küçük boyutlarından dolayı bağırsakta serbest yağ asitlerine hidrolize edilirler ve hızla emilirler. Kaprilik asit trigliseridinin, nöronal metabolizma için alternatif bir enerji substratı olarak işlev görebildiği gösterilmiştir. Kaprilik asit, nöbet tedavisinde olumlu etkileri öne sürülen orta zincirli trigliserit diyetinin ana bileşeni olup kan-beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir (Perlman ve Goldstein, 1984; Sills ve ark., 1986; Spector, 1988; Wlaź ve ark., 2012; Zhao ve ark., 2012). Çalışmamızda zebra balığı embriyolarında rotenon toksisitesi durumunda kaprilik asidin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOD

### Zebra Balıklarının Yetiştirilmesi

Zebra balıkları günde 14 saat gün ışığına, 10 saat karanlığa maruz kalacak şekilde büyütüldü. Sıcaklık ve nem sırasıyla 28.5°C ve % 61 olarak ayarlandı. Sıcaklık kontrolü akvaryum için kullanılan özel termostatla sağlandı. Suyun pH'sının 7-8 arasında kalması sağlandı. Günde iki kez olmak üzere balık yemi ile beslendiler. Çalışmada rotenon grubu, kontrol grubu, düşük doz kaprlik asit ve yüksek doz kaprilik asit verilen gruplar olmak üzere 4 grup oluşturuldu ve her gruba 15 balık konuldu.

### Rotenon Maruziyeti

Rotenon maruziyeti için son doz 5µg/ml olacak şekilde rotenon balıkların bulunduğu 7 litrelik akvaryumlara ilave edildi ve 30 gün boyunca 3 günde bir olmak üzere akvaryumların suları değiştirildi.

### Kaprilik Asit ile Muamele

Deney süresi boyunda 3 günde bir olmak üzere zebra balıklarına gavaj yapılarak iki farklı doz (düşük doz: 20mg/ml ve yüksek doz: 60 mg/ml ) ile tek seferde 5µl kaprilik asit verildi.

### Lokomotor Aktivite

Deney sonunda tüm gruplarda balıkların hareketliliklerinde değişiklik olup olmadığını belirlemek için lokomotor aktivite ölçüldü. Bu amaçla boyutları (25 cm x 9 cm x 6.25 cm) ve hacmi (1,5 L) olan tank kullanıldı. Tankın alt kısmına görülebilecek şekilde eşit uzaklıkta (6.25 cm) dik çizgiler çizilerek 5 dk boyunca zebra balıklarının hareketleri izlendi ve geçtikleri çizgiler sayıldı (Bretaud ve ark., 2004).

**Biyokimyasal Parametreler**

**Lipid Peroksidasyon Seviyesi (LPO)**

Karaciğer dokuları ile hazırlanan homojenatlarda malondialdehit (MDA) düzeyi, tiyobarbitürik asit reaktif substrat olarak kullanılarak belirlendi.1.56 x 105 $M^{-1}$ $cm^{-1}$ ekstrinksiyon katsayısı kullanıldı ve LPO, MDA eşdeğeri olarak nmol MDA / mg protein olarak ifade edildi (Ledwozyw ve ark., 1986).

**Nitrik Oksit Seviyesi (NO)**

Nitrik oksit (NO), vanadyum (III) klorür ile nitratın nitrite indirgenmesine dayanan Miranda yöntemi ile belirlendi (Miranda vd., 2001). Asidik bir ortamda nitrit ve sülfonilamid, N- (1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür ile reaksiyona girer ve kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Renkli kompleks bir spektrofotometre ile 540 nm'de ölçüldü ve sonuçlar nmol NO / mg protein olarak ifade edildi.

**Glutatyon *S* Transferaz Aktivitesi (GST)**

GST' nin aktivitesi, GSH ve 1 - kloro - 2,4 - dinitro - benzenin konjügasyonu ile oluşturulan ürünün 340 nm'deki absorbansın spektrofotometrik değerlendirmesine dayanılarak belirlendi (Habig ve Jakoby, 1981).

**Süperoksit Dismutaz Aktivitesi (SOD)**

Karaciğer homojenatlarındaki SOD aktivitelerini belirlemek için SOD' nin riboflavin duyarlı *o*- dianisidinin etkisini arttırma kabiliyetine dayanan bir yöntem kullanıldı ve ürünün absorbansı, spektrofotometre ile 460 nm'de ölçüldü (Mylroie ve ark., 1986). Net absorbans, 0 ve 8. dakika aydınlatmada absorbansların ölçülmesiyle hesaplandı. Sonuçlar U / mg protein olarak ifade edildi.

**Glutatyon Tayini (GSH)**

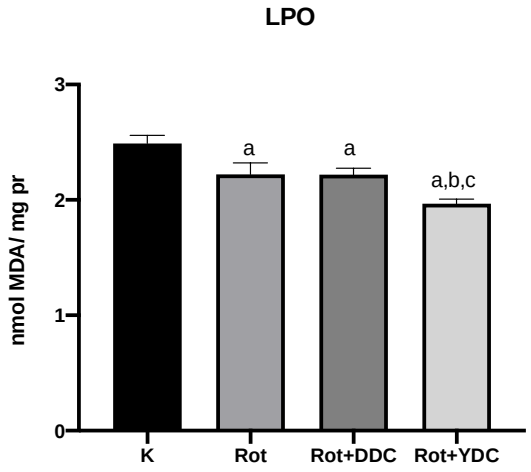
Karaciğer homojenatlarında GSH tayini yapılırken Beutler yöntemi aracılığıyla Elmann ayıracı, 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoikasid ( DTNB ) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirildi (Beutler, 1986).

**Total Protein Miktarı**

Total protein seviyesi Lowry yöntemi ile belirlendi. Yöntemde alkalin proteinleri bakır iyonları ile reaksiyona sokulur ve daha sonra Folin reaktifi ile indirgenir. Ürünün absorbansı, 500nm'de bir spektrofotometre ile değerlendirildi ve protein başına parametrelerin sonuçlarını ifade etmek için hesaplandı (Lowry ve ark., 1951).

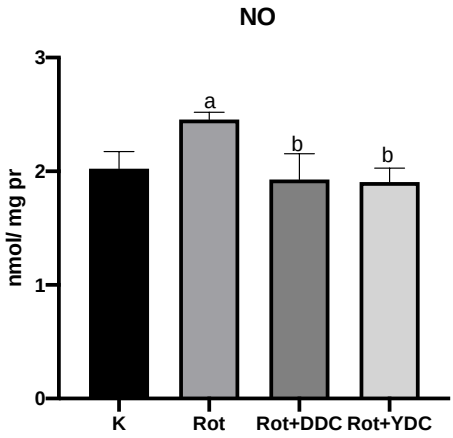
**BULGULAR ve TARTIŞMA**

Çalışmamızın sonuçlarına göre LPO değerleri Rot+YDC grubunda K, Rot ve Rot+DDC gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır ($p< 0,05$). Grupların LPO düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 1'de verilmiştir. Rot grubunda K grubuna göre anlamlı bir fark görülmemesi bu grupta artan GSH düzeylerine bağlı olduğu öne sürülebilir. Yüksek dozda kaprilik asit ise LPO'yu tüm gruplarda azaltarak olumlu yönde etki göstermiştir.



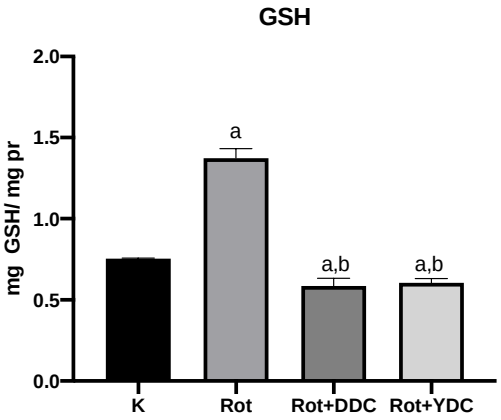

**Şekil 1:** Kontrol, Rotenon (Rot), Rotenon ile beraber Düşük Doz Kaprilik Asit (Rot+DDC) ve Yüksek Doz Kaprilik Asit (Rot+YDC) gruplarında karaciğer lipit peroksidasyon (LPO) düzeyleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a] p< 0,05 Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı [b] p< 0,05 Rot grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı [c] p< 0,05 Rot+DDC grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

NO seviyeleri Şekil 2' de görüldüğü gibidir. Rot grubu K grubu ile kıyaslandığında NO seviyeleri anlamlı derecede artmıştır ( p< 0,05). Rot+DDC ve Rot+ YDC gruplarında Rot grubuna göre anlamlı derecede azalma görülmektedir (p< 0,05).



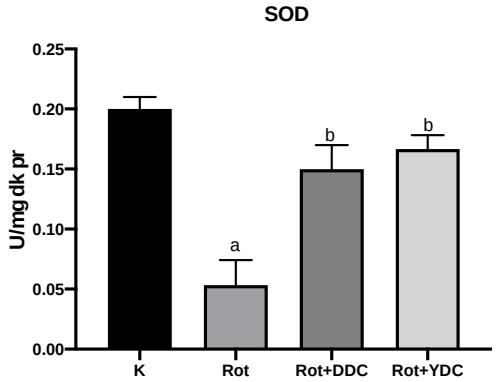

**Şekil 2:** Kontrol, Rotenon (Rot), Rotenon ile beraber Düşük Doz Kaprilik Asit (Rot+DDC) ve Yüksek Doz Kaprilik Asit (Rot+YDC) gruplarında gruplarında karaciğer nitrik oksit (NO) düzeyleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a] p< 0,05 Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı [b] p< 0,05 Rot grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

GSH tayini sonucu elde edilen veriler Şekil 3' te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre Rot grubunda GSH seviyeleri K grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede artış görülmektedir ([a]p< 0,05). Rot+DDC ve Rot+YDC grupları Rot grubu ile kıyaslandığında ise GSH seviyelerinde anlamlı derecede azalma görülmektedir ( p< 0,05).



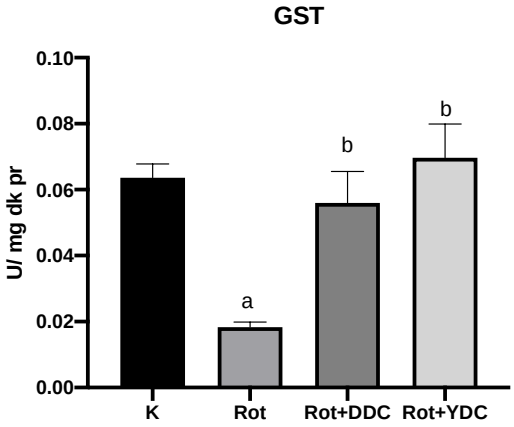

**Şekil 3:** Kontrol, Rotenon (Rot), Rotenon ile beraber Düşük Doz Kaprilik Asit (Rot+DDC) ve Yüksek Doz Kaprilik Asit (Rot+YDC) gruplarında Doz BFA (YDBFA) gruplarında karaciğer indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a] $p< 0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı [b] $p< 0,05$ Rot grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

SOD aktivitesinin sonuçları Şekil 4' te görüldüğü gibidir. K grubuyla kıyaslandığında Rot grubunun SOD aktivitesi anlamlı derecede azalmıştır ([a]$p< 0,05$). Rot+DDC ve Rot+YDC grupları Rot grubu ile kıyaslandığında SOD aktivitesinde anlamlı derecede artış görülmektedir ($p< 0,05$).




**Şekil 4:** Kontrol, Rotenon (Rot), Rotenon ile beraber Düşük Doz Kaprilik Asit (Rot+DDC) ve Yüksek Doz Kaprilik Asit (Rot+YDC) gruplarında karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a] $p< 0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı [b] $p< 0,05$ Rot grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

GST aktivitesi Şekil 5'te görüldüğü gibidir. Rot grubu K grubu ile kıyaslandığında GST aktivitesinin anlamlı derecede azaldığı görülmektedir ($p< 0,05$). Rot+DDC ve Rot+YDC grupları Rot grubu ile kıyaslandığında ise GST aktivitelerinde anlamlı derecede artış olduğu görülmektedir ( $p< 0,05$).




**Şekil 5:** Kontrol, Rotenon (Rot), Rotenon ile beraber Düşük Doz Kaprilik Asit (Rot+DDC) ve ve Yüksek Doz Kaprilik Asit (Rot+YDC) gruplarında karaciğer Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktiviteleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. [a] $p< 0,05$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı [b] $p< 0,05$ Rot grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede farklı

## SONUÇ

Çalışmamızın sonuçları, rotenona maruz bırakılan zebra balıklarının karaciğer dokusunda kaprilik asidin bozulan oksidan-antioksidan dengeyi düzeltmeye yönelik olumlu etkilerini göstermiştir. Zehirsizleştirme reaksiyonlarının gerçekleştiği organ olan karaciğerde rotenon toksisitesi durumunda kaprilik asidin etkisinin mekanizmasına dair moleküler düzeyde daha detaylı incelenmelere ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

Beutler E 1986. Red cell metabolism : a manual of biochemical methods. *Toxicol Appl Pharmacology*, *82*(15): 512–520.

Bretaud S, Lee S & Guo S 2004. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicology and Teratology*, *26*(6): 857–864.

Decuypere JA & Dierick NA 2003. The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to in-feed antibiotics in piglets: concept, possibilities and limitations. An overview. *Nutrition Research Reviews*, *16*(2): 193–210.

Habig WH & Jakoby WB 1981. Assays for Differentiation of Glutathione S-Transferases. *Methods in Enzymology*, *77*(C): 398–405.

Khatri D & Juvekar A 2016. Abrogation of locomotor impairment in a rotenone-induced Drosophila melanogaster and zebrafish model of Parkinson′s disease by ellagic acid and curcumin. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, *6*(2): 90.

Khotimah H, Sumitro S & Aris Widodo M 2015. Epigenetic of Parkinson's on Zebrafish model Parkinson's View project The Role Of Astaxanthin Compared With Metformin In Preventing Glycated Human Serum Albumin From Possible Unfolding: A Molecular Dynamic Study. *Article in International Journal of PharmTech Research*.

Ledwoz;yw A, Michalak J, Stępień A & Kądziołka A 1986. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, *155*(3): 275–283.

Lewitt PA 2008. Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *The New England journal of medicine*, *359*(23): 2468–2476.

Lill CM 2016. Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Probes*, C. 30: 386–396.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A & Randall R 1951. Protein measurement with the Foliphenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, *193*(1): 265–275.

Martel S, Keow JY & Ekker M 2015. Rotenone Neurotoxicity Causes Dopamine Neuron Loss in Zebrafish.

*University of Ottawa Journal of Medicine*, *5*(2): 16–21.

Miranda KM, Espey MG & Wink DA 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, *5*(1): 62–71.

Mylroie AA, Collins H, Umbles C, & Kyle J 1986. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and applied pharmacology*, *82*(3): 512–520.

Nosaka N, Maki H, Suzuki Y, Haruna H, Ohara A, Kasai M, … Kondo K 2003. Effects of margarine containing medium-chain triacylglycerols on body fat reduction in humans. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, *10*(5): 290–298.

Perlman BJ, & Goldstein DB 1984. Membrane-disordering potency and anticonvulsant action of valproic acid and other short-chain fatty acids. *Molecular pharmacology*, *26*(1): 83–89.

Sills MA, Forsythe WI, Haidukewych D, MacDonald A & Robinson M 1986. The Medium Chain Triglyceride diet and intractable epilepsy. *Archives of Disease in Childhood*, *61*(12): 1168–1172.

Spector R 1988. Fatty Acid Transport Through the Blood-Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry*, *50*(2), 639–643.

Wang Y, Liu W, Yang J, Wang F, Sima Y, Zhong Z, … Liu CF 2017. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. *NeuroToxicology*, *58*: 103–109.

Wlaź P, Socała K, Nieoczym D, Łuszczki JJ, Arnowska I, Arnowski T, … Gasior M 2012. Anticonvulsant profile of caprylic acid, a main constituent of the medium-chain triglyceride (MCT) ketogenic diet, in mice. *Neuropharmacology*, *62*(4): 1882–1889.

Zhao W, Varghese M, Vempati P, Dzhun A, Cheng A, Wang J, … Pasinetti GM 2012. Caprylic Triglyceride as a Novel Therapeutic Approach to Effectively Improve the Performance and Attenuate the Symptoms Due to the Motor Neuron Loss in ALS Disease, *PLoS ONE*, *7*(11).

# Investigation of antibacterial activities of fruit extracts against *Enterococcus faecalis*

Kubra Tutkun[1*], Taner Sar[1*], Elif Kalpar[1*], Meltem Yesilcimen Akbas[1*]

[*1]Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University, Gebze-Kocaeli, Turkey.

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

**Abstract**

The antimicrobial activities of fruit extracts prepared by different methods were investigated on *E. faecalis*. Extracts were prepared using different solvents including distilled water, ethanol and methanol. Microwave-assisted extraction (MAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE) methods were performed. Antimicrobial activities of extracts were determined by agar well diffusion method. According to results, the highest antimicrobial activity was observed in ethanol extracts with diameter of 14 mm using ethanol solution with MAE and UAE methods.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, extraction, natural antimicrobial effect, well diffusion method

## INTRODUCTION

*Enterococcus* species are found in milk, and fermented food products. They are also found in the gastrointestinal (GI) tracts of eukaryotes (Lebreton et al, 2014; Sharon Goh et al, 2017). *Enterococcus faecalis* is associated with a variety of medical device-related and biofilm-associated hospital infections, central venous catheter bloodstream infections, and orthopedic implant infections (Higuita and Huycke, 2014). Moreover, *E. faecalis* is largely susceptible to many antibiotics (Hidron et al, 2006-2007).

Plants have been well known for their versatile applications particularly for their medicinal use (Cowan 1999; Wang, 2008; Dias et al, 2012) since they are source of biologically active compounds. Phytochemicals found in plants are phenolic and polyphenolics, terpenoids, alkaloids and lectins may have antimicrobial activities (Borger et al, 2015). These antimicrobial activities related on increase the inner membrane permeability and cell membrane disruption (Mirzoeva et al, 1997). It was reported that tannins show bacteriostatic and bacteriocidal effects on harmful bacteria *E. coli*, *Listeria*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp, and *Streptococcus* spp. (Chung et al, 1998; Akiyama et al, 2001; Haniffa and Kayitha, 2012).

The *Rosaceae* family, which has more than 100 species, is a good source of vitamines and phytochemicals (Ayati et al, 2018). *Rosaceae* family members are also used by folk medicine (Gurbuz et al, 2003). In a study, *Agrimonia pilosa*, a member of *Rosaceae* family, showed antimicrobial effect against *K. pneumonia*, *P. auroginosa*, *R. solanacearum* (Dhami et al, 2018). In another study, *Rosa canina* which is also a member of *Rosaceae* family has antimicrobial effect against *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia* and *Acinetobacter baylyi* (Wang et al, 2020).

In this study, the antimicrobial effects of extracts obtained from fruits member of *Rosaceae* family against *E. faecalis* were investigated.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strain

In this study, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 was incubated overnight at 37 °C in 2% glucose (w/v) containing tryptic soy broth (TSB).

## Extraction

The fruits were dried and ground with a blender. The mixture of dried and ground fruit with solvents were prepared. The dried and ground fruit was mixed with ethanol, methanol, and distilled water, separately. For this, 10 g ground fruit and 100 ml solvent were mixed in a 500 ml flask. Then, fruit solutions were extracted by using microwave (MAE) or ultrasound assisted water (UAE) methods.

In UAE method; the solution which has 10% ground fruit was extracted in a water bath for 2 hours at 80 °C. In MAE method; the solution which has 10% ground fruit was extracted in a microwave for 6 minutes, at 120 W. And then, extracts were evaporated at 60 °C, 70 rpm.

## Antibacterial activity

The $OD_{600}$ value of *E. faecalis* pre-culture was adjusted less than 1 OD value by using physiological saline water and 100 µl of this culture was inoculated and spread on Mueller Hinton Agar (MHA). For each extract application, wells of 7mm diameter were punched into the agar. Different concentrations of extracts (with 1, 1/2 and 1/4 dilution), prepared by distilled water and gentamicin (1 mg/ml) (Joy and George, 2014) were added to the wells in an amount of 40 µl. Distilled water was used as negative control and gentamicin was used as positive control for investigating of antimicrobial activities. Petri dishes which containing bacteria and extracts were incubated at 37 °C for overnight.

## RESULTS

In this study, antimicrobial effects of 6 different fruit extracts on *E. faecalis* was determined. (Table 1).

In general, the best antimicrobial effect was observed in all extracts in direct application of all extracts (1 dilution), whereas no antimicrobial effect was observed in 1/4 dilutions (Table 1). The highest antimicrobial effect was observed in extracts prepared by MAE and UAE methods with a diameter of 14 mm when ethanol was used as a solvent. There was no antimicrobial effect observed at 1/2 and 1/4 dilutions Dwater-UAE extract.

According to obtained results, all prepared extracts exhibited antimicrobial effects on *E. faecalis*. For, this reason, different extraction methods of natural fruit or fruit industry wastes should be investigated for practical use as natural food presevatives.

**Table 1**. Antimicrobial effect (mm) of extracts, gentamicin and distiled water on *E. feacalis.*

| | **1** | **1/2** | **1/4** |
|---|---|---|---|
| **MAE (Dwater) (mm)** | **13** ± 0.5 | **9** ± 0.5 | **0** ± 0 |
| **UAE (Dwater) (mm)** | **11** ± 0 | **0** ± 0 | **0** ± 0 |
| **MAE (with MEOH) (mm)** | **12** ± 1 | **10** ± 0.5 | **0** ± 0 |
| **UAE (with MeOH) (mm)** | **12** ± 0.5 | **10** ± 0.5 | **0** ± 0 |
| **MAE (with EtOH) (mm)** | **14** ± 0.5 | **9** ± 0.5 | **0** ± 0 |
| **UAE (with EtOH) (mm)** | **14** ± 0.5 | **10** ± 0 | **0** ± 0 |
| **Gentamicin (mm)** | **20** ± 0 | | |
| **Distilled Water (mm)** | **0** ± 0 | | |

## DISCUSSION

Pathogenic microorganisms have developed resistance as a result of widespread and uncontrolled use of conventional antibiotics. There are numerous reports for phytochemicals with their antibacterial activities on pathogenic bacteria (Gibbons, 2004; Hemaiswarya et al, 2008; Hemaiswarya and Doble 2009).

Phytochemicals can cause distruption of the cell wall, disruption of the cytoplasmatic membrane, damage to membrane proteins, infiltration of intracellular contents, coagulation of the cytoplasm and depletion of the proton are currently reported as mechanisms responsible for cell death (Cowan, 1999; Saleem et al, 2010; Samy and Gopalakrishnakone, 2010; Savoia, 2012; Borges et al, 2013). Different solvents can reveal different phytochemicals (Ngadiran et al, 2019) and these chemicals may act on pathogenic bacteria by different mechanisms and cause antimicrobial activities (Borges et al, 2015).

Although ultrasound water bath is generally used in extraction, microwave extraction has also been applied recently (Martino et al, 2008; Petkova et al, 2017). In this study, no significantly difference was observed between the two methods. Similar results were also obtained with two methods in previous studies (Martino et al, 2008, Vázquez et al 2019). However, some studies showed that MAE method was more effective than the other methods (Petkova et al, 2017; Vinatoru et al, 2017; Da Rosa et al, 2019).

## CONCLUSION

In this study, antimicrobial effects of a total of six extracts prepared with different methods on *E. faecalis* were investigated by well diffusion method. The highest antimicrobial effect was observed in extracts prepared by using ethanol with both MAE and UAE method (14 mm). However, antimicrobial effect was observed in all samples when the extracts were used directly or at 1/2 dilution with MAE and UAE methods. According to these results, phytochemicals in fruit extracts have inhibitory effect on pathogenic bacteria.

### Acknowledgements

We would like to thank Gebze Technical University (2018-A101-04), Turkey

## REFERENCES

Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K 2001. Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48(4): 487-491.

Ayati Z, Amiri MS, Ramezani M, Delshad E, Sahebkar A, Emami SA 2018. Phytochemistry, traditional uses and pharmacological profile of rose hip: A review. Current pharmaceutical design, 24(35): 4101-4124.

Borges A, Ferreira C, Saavedra M.J, Simoes M 2013. Antibacterial activity and mode of action of 1243 ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. Microbial Drug Resistance, 19(4): 256-265.

Borges A, J Saavedra M, Simoes M 2015. Insights on antimicrobial resistance, biofilms and the use of phytochemicals as new antimicrobial agents. Current Medicinal Chemistry, 22(21): 2590-2614.

Chung KT, Lu Z, Chou MW 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology, 36(12): 1053-1060.

Cowan MM 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 564-582.

Cushnie TPT, Lamb AJ 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26(5): 343-356.

Da Rosa GS, Vanga SK, Gariepy Y, Raghavan V 2019. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea L.*). Innovative Food Science & Emerging Technologies, 58: 102234.

Dhami D, Shah G, Kumar V, Joshi Y, Tripathi M, Bisht M 2018. Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of Agrimonia Pilosa Ledeb (*Rosaceae*). Chemical Science, 7(3): 499-505.

Dias DA, Urban S, Roessner U. 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. Metabolites, 2(2): 303-336.

Gibbons, S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. Natural Product Reports, 21(2): 263-277.

Gürbüz I, Üstün O, Yesilada E, Sezik E, Kutsal O 2003. Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. Journal of ethnopharmacology, 88(1): 93-97.

Haniffa, M.A.; Kavitha, K 2012. Antibacterial activity of medical herbs against the fish pathogen Aeromonas hydrophila. International Journal of Agricultural Technology, 8(1): 205-211.

Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine, 15(8): 639-652.

Hemaiswarya S, Doble M 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram-negative bacteria. Phytomedicine, 16(11): 997-1005.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK 2008. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. Infection Control & Hospital Epidemiology, 29(11): 996-1011.

Higuita NIA, Huycke MM 2014. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. In Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Joy GS, George PHILOMENA (2014). Antimicrobial screening of Alfalfa (*Medicago sativa*) in various bacterial strains. International Journal of Pharmaceutics & Drug Analysis, 2: 65-9.

Lebreton F, Willems RJ, Gilmore MS 2014. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Martino E, Collina S, Rossi D, Bazzoni D, Gaggeri R, Bracco F, Azzolina O 2008. Influence of the extraction mode on the yield of hyperoside, vitexin and vitexin-2″-O-rhamnoside from *Crataegus monogyna Jacq.* (hawthorn). Phytochemical analysis, 19(6): 534-540.

Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiological Research, 152(3): 239-246.

Muthuswamy S, Rupasinghe HPV, 2007. Fruit phenolics as natural antimicrobial agents: Selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin. Journal of Food, Agriculture and Environment, 5(3-4): 81-85.

Ngadiran, S, Muhamad II, Aziz R, Yaakob H, Nor A, Farahiyah N, Jamil M 2019. Effect of Solvent Types on Gaharu (*Aqualaria malaccensis*) Extract Quality and its Chemical Compound. In Key Engineering Materials Trans Tech Publications, 797: 202-210.

Petkova N, Ivanova L, Filova G, Ivanov I, Denev P 2017. Antioxidants and carbohydrate content in infusions and microwave extracts from eight medicinal plants. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7(10): 055-061.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM 2005. Bioactive berry compounds - Novel tools against human pathogens. Applied Microbiology and Biotechnology, 67(1): 8-18.

Saleem M, Nazi, M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. Natural Product Reports, 27(2): 238-254.

Samy RP, Gopalakrishnakone P 2010. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug 1219 discovery. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 7(3): 283-294.

Savoia D 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. Future Microbiology, 7(8): 979-990.

Simões M, Bennett RN, Rosa EA 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. Natural Product Reports, 26(6): 746-757.

Wang Y 2008. Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. Phytochemistry Reviews, 7(3): 395-406.

Vázquez-Espinosa M, González de Peredo AV, Ferreiro-González M., Barroso CG, Palma M, Barbero GF, Espada-Bellido E 2019. Optimizing and Comparing Ultrasound-and Microwave-Assisted Extraction Methods Applied to the Extraction of Antioxidant Capsinoids in Peppers. Agronomy, 9(10): 633.

Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I 2017. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 97: 159-178.

Wang Y, Liang Y, Cock IE 2020. *Rosa canina* L. Fruit Extracts Inhibit the Growth of Bacterial Triggers of some Autoimmune Inflammatory Diseases and Potentiate the activity of Conventional Antibiotics. Pharmacognosy Communications, 10(1).

# Neurochemicals That Affect SHSY-5Y Cell Differentiation and Cell Response

Gül Öncü[1], Meryem Şahin[1], Hale Saybaşılı[1]*

*[1]Boğaziçi University, Biomedical Engineering Institute, İstanbul, Turkey.

*Corresponding author: saybasil@boun.edu.tr

**Abstract:**

SHSY-5Y cell line is used widely for neurobiological experiments. These cells have cancer cell characteristics without differentiation, but they can differentiate into neuron-like cells under different chemicals. In our study, SHSY-5Y cells are differentiated under different chemical mediums and their electrophysiological characteristics are observed. The effects of dopamine, nicotine, and rotenone to cell responses are measured with the whole-cell patch-clamp method as well. These chemicals are used to characterize the differentiated cells' ion channels. As a result, retinoic acid and BDNF is found to increase the activity of voltage-gated ion channels, thus the inward current flow. Dopamine is found to decrease both inward and outward currents proportional to increasing doses in line with the literature. Nicotine is found to increase inward current slightly (7.89% decrease) and rotenone is found to block cell response to given potentials.

**Keywords:** SHSY-5Y, Cell differentiation, Dopamine, Nicotine, Rotenone.

## Introduction

SHSY-5Y cells are widely used in laboratory studies, especially in neuroscience. SH-SY5Y neuroblast-like cells are a subclone of the parental neuroblastoma cell line SK-N-SH. The parental cell line was generated in 1970 from a bone marrow biopsy that contains both neuroblast-like and epithelial-like cells[1] and provides an ease of use in in-vitro studies. With the help of cell culture, in-vitro analyses can be done without harming any animal or can be used as a preliminary study for animal experiments. Considering the cell line is obtained from human, it can also provide more human-related results[2].

Even though it provides a wide variety of use in neurological studies, the literature does not contain a consensus on a clear protocol to be used. Most of the time undifferentiated neuroblastoma cells are used to analyze neurons. Only a few of them use differentiating agents such as retinoic acid (RA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), cholesterol (CHOL), estradiol (E2), phorbol esters or terephthalic acid (TPA). These chemicals, used in the process of differentiation can alter the cell type as cholinergic, adrenergic or dopaminergic.[3,4] Each protocol leads to different cellular characteristics and unfortunately results in unreliable information in the literature.

The differences between the differentiated and undifferentiated cells can be observed under a microscope; the undifferentiated cells have a more globular shape and differentiated cells have more neurites. Moreover, once the cells are differentiated, they do not proliferate anymore. However, the cells differentiated in different mediums do not show differences observable under a microscope. They may seem similar; however, their cell membrane proteins show differences, which leads to different functioning of the cells and it also affects their responses[5].

To be able to characterize them and understand the differences, electrophysiological recordings are superior in comparison to other laboratory techniques. The whole-cell patch-clamp method provides this information. By applying a voltage clamp, we can measure the inward and outward currents and understand the $Na^+$, $Ca^{2+}$ and $K^+$ channel density accordingly. Moreover, their sensitivity to rotenone, nicotine, and dopamine can be characterized and further studies can be carried out accordingly.

Rotenone is a neurodegenerative agent that is used for modeling Parkinson's Disease, it affects the dopaminergic neurons[6]. It is expected to affect tolbutamide-sensitive channels with an increase in the outward current[7].

Nicotine is a neurotransmitter that mimics acetylcholine (ACh) and binds to acetylcholine receptors. It is found abundantly in both central and peripheral nervous system[8,9]. ACh, when bound to ACh receptors on the postsynaptic terminals, can depolarize the cell and increase the calcium flux[10]. If the differentiated cells contain ACh receptors, we expect an increase in the inward current. Depending on the increase of this flux, we can determine the density of ACh receptors.

Dopamine is another neurotransmitter that can be used to activate cell membrane receptors. There are 5 subtypes of dopamine receptors[11] and D1 and D2 subtypes being the predominant forms in the dorsal striatum affect $Na^+$ and $K^+$ flow. Depending on these subtypes, the receptors can act as both inhibitory and excitatory[12]. In our experiments, we can detect the probable presence of dopamine receptors on SHSY-5Y cells and according to the cell response, we can understand whether the receptors are excitatory or inhibitory.

In our study we examined the differences the chemicals can create on SHSY-5Y cells in differentiation state. To understand the ion channel concentrations and the cell responsivity to rotenone, dopamine, and nicotine electrophysiological experiments are carried out.

**Materials and Methods**

Cell Culture: SH-SY5Y cell line was kindly provided by Dr. Bora Garipcan (Institute of Biomedical Engineering, Boğaziçi University). Cells were cultured according to the literature with some changes in the concentrations of RA and BDNF (Encinas et al., 2002). Briefly, cells were grown using Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Ham's F12 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (Biosera, France). 3x104 cells were seeded on a 24-well plate and incubated at 37 °C.

Differentiation: 24 hours after seeding, differentiation medium containing 1 µM, 5µM and 10µm RA with 1% FBS was added. Five days later, the medium was replaced with serum-free medium containing 10 ng/mL BDNF, 1nM estradiol and 5µg/ml cholesterol. After 48 hours, differentiated cells were ready to use for the experiments for 3-4 days.

Electrophysiology: Electrophysiology experiment procedures are applied according to the literature.[5] The silver recording and grounding electrodes are dipped into NaClO solution to cover them with AgCl for 1 hour before the experiment. At the same time, the glass micropipettes are prepared and filled with intracellular fluid (ICF) composed of 140 mM KCl, 4 mM NaCl, 0.8 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$ and 10 mM HEPES. Extracellular fluid (ECF) containing 125 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$,10 mM HEPES is warmed to room temperature and 2 mM CaCl2 and 10 mM glucose is added afterwards.

Cover glasses that the cells are seeded are transferred to a petri dish for the experiments. The cells that will be used for recording *were* selected under the microscope. Then the recording electrode is assembled, and both the electrodes are dipped into the petri dish. Positive pressure is applied to eliminate any blocking of the glass micropipette due to impurities. The potential is set to -90 mV which is the resting potential of the SHSY-5Y. The pipettes are only used if their resistance is between 3-5 MOhm. The cells are approached with the glass micropipettes using micromanipulators. After touching the cells, negative pressure is applied through a suction tube to touch the cells. Decreasing the number of ions results in an increase in the resistance. As the resistance reaches to 500-1000 MOhm, the cells are ruptured with a small suction. The cell rupture can be monitored with the capacitance change. After the cells are ruptured, they are ready for recording. In this experiment, we prepared a 10-step protocol that includes a 10 mV increase in each step. 10 recordings are obtained from each cell. The recordings are then analyzed in MATLAB for comparison.

## Results

The condition of cells is observed via the microscope. The differentiated cells can survive in the culture medium for up to 4 days. The undifferentiated cells continue proliferating, so they require changing of the medium. They can also form clusters and be unable to examine if they proliferate uncontrollably.

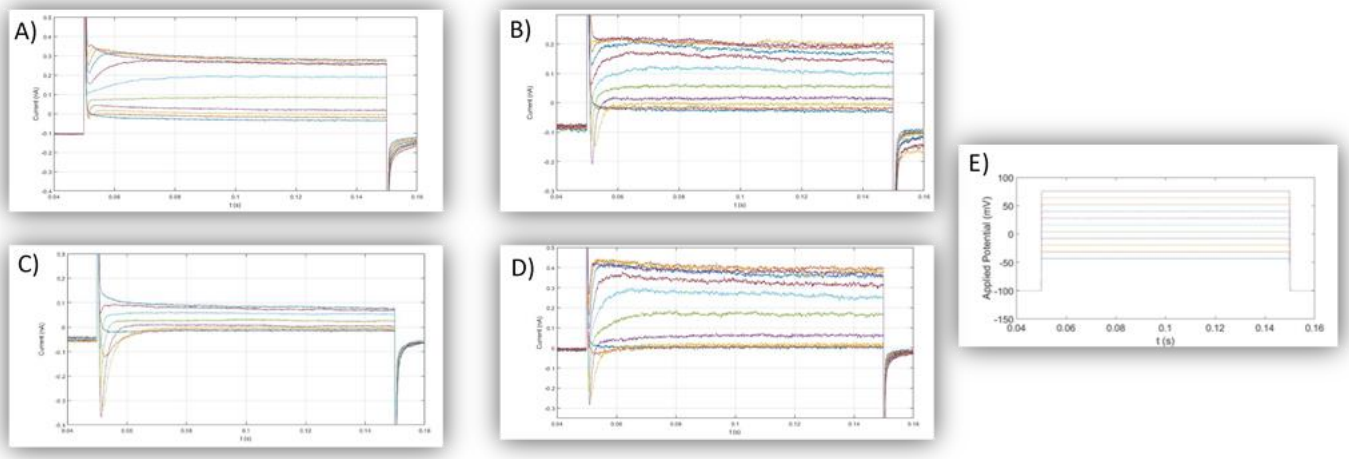



***Figure 1: A)*** *Response of SHSY-5Y undifferentiated cells to given potential protocol.* ***B)*** *The response of SHSY-5Y cells differentiated with 1 µM RA.* ***C)*** *The response of SHSY-5Y cells differentiated with 1 µM RA and 10 ng/mL BDNF.* ***D)*** *Response of SHSY-5Y cells differentiated with 1 µM RA, 10 ng/mL BDNF, 1nM estradiol and 5µg/ml cholesterol.* ***E)*** *The protocol applied to cells, it starts from -50 mV and increases 10 mV in each step, finishing at +50 mV. The duration of the applied potential is 150 ms.*

If the cells are ready, they are taken to ECF. Healthy cells are selected under the microscope and whole-cell patch-clamp is applied using micromanipulators. After cells form giga-seal and then ruptured, a 10-step voltage-clamp protocol -starting from -50 mV with a 10 mV increase in each step and finishing at +50 mV- is applied to the cells (Figure 1-E). Their current flows are recorded.

Cell leak was less than 0.1 nA, so we can be sure of the results are the inward and outward currents of the cells in response to applied potential, increasing the confidence level of the results.

From the responses of the cells that receive the same protocol, we can observe a huge difference in the characteristics. In undifferentiated cells (Figure 1-A) there is a very small inward current and the outward current is high disproportionately. Retinoic acid added to cell differentiation medium has helped the cells to develop $Na^+$ and $Ca^{2+}$ channels so that we can see an increased amount of inward current to the cells (Figure 1-B). With the addition of BDNF to the differentiation medium, the inward current is further increased (Figure 1-C) and the cells differentiated with RA + BDNF are much more responsive in higher potentials compared to RA group but the not undifferentiated group. Also, by experience, RA + BDNF group was much more elastic and easier to patch during experiments. With the addition of estradiol and cholesterol in addition to RA and BDNF, the inward current decreased and outward current increased and the ion channels for outward current opened much more rapidly (Figure 1-D).

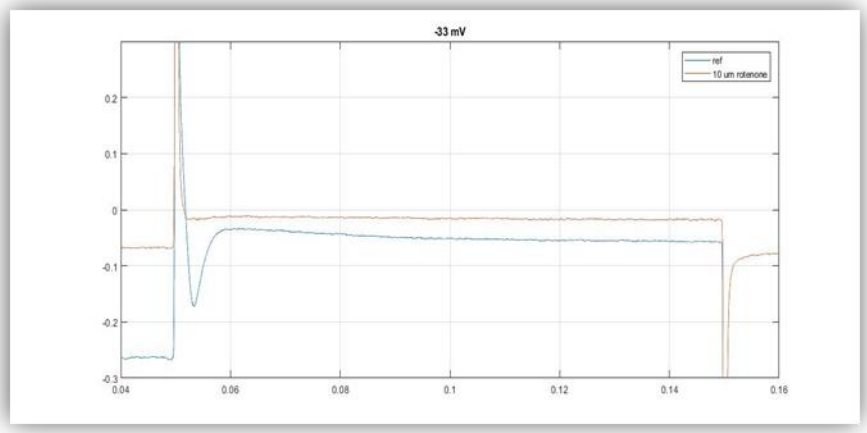



***Figure 2:*** *SHSY-5Y cells differentiated with 1μM RA and after addition of 10 μM Rotenone comparison under -33 mV*

To eliminate the differences that can stem from different cells, the addition of dopamine, nicotine, and rotenone are done on the same cell after control results are taken. Comparisons are done according to that cell without the addition of any chemical. The results are compared under the potentials where the cell response is maximum.

After the addition of rotenone to the experiment medium, the cell response stopped within minutes. Even though the cell survived, the inward and outward current is eliminated immediately (Figure 2). After 10 minutes the cell died.

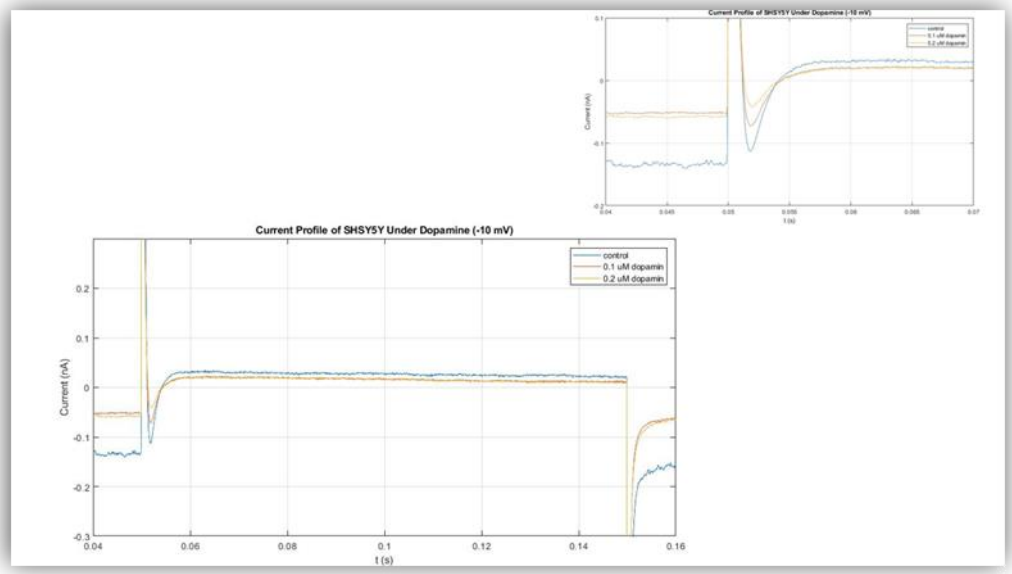



***Figure 3:*** *SHSY-5Y cells differentiated with 1μM RA and after addition of Dopamine (0.1 μM and 0.2 μM) comparison under -10 mV*

After the addition of dopamine, the inward current is increased proportionally to increasing doses. As opposed to inward current, the outward current is decreased.

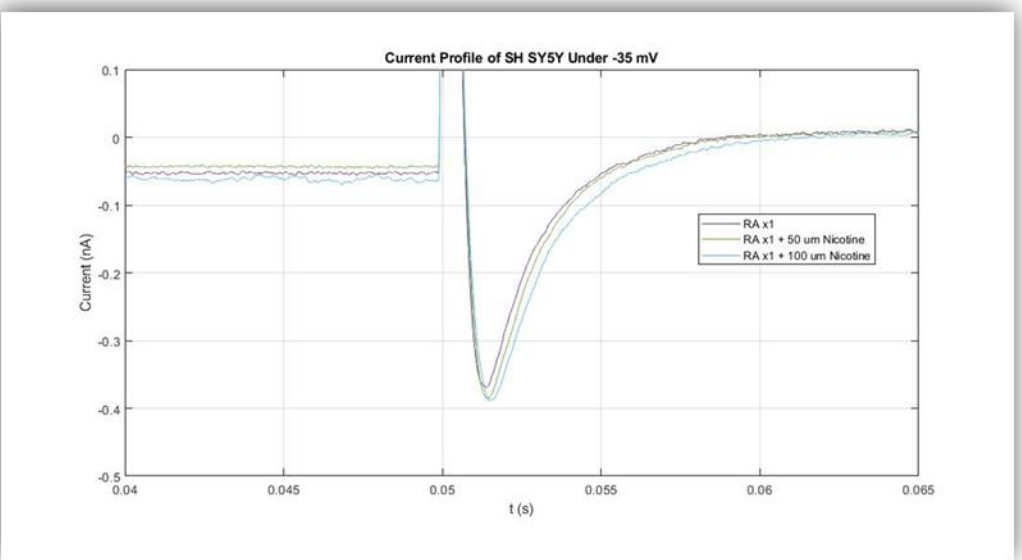



***Figure 4:*** *SHSY-5Y cells differentiated with 1μM RA and after addition of Nicotine (50μM and 100 μM) comparison under -35 mV*

After the addition of nicotine to the experiment medium, the inward current is increased slightly proportional to the increasing doses whereas, the outward current is remained unchanged.

**Discussion:**

The electrophysiological experiments clearly show a need for a standard procedure since the chemicals during the differentiation process affects the cell characteristics. First of all, the undifferentiated neuroblastoma cells do not have enough ion channels to be considered as a neuron cell. From the observations, we can say they have a limited number of $Na^+$ or $Ca^{2+}$ channels leading to a small inward current. However, their response to given potentials is proportional, meaning we are mostly measuring the applied potential.

The addition of retinoic acid increases the inward current towards the cell. With the addition of brain-derived neurotrophic factor, estradiol, and cholesterol, we obtain a more characteristic action potential. We can conclude that the addition of these chemicals during differentiation helps us to obtain a more neuron-like cell to work with.

Rotenone has stopped the inward current while a slight increase in the outward current can be observed. This phenomenon is observed in the dopaminergic neurons; rotenone-induced the tolbutamide sensitive outward current. Rotenone is a neurodegenerative neurotoxin and in line with this, the RA differentiated SH-SY5Y cells have died 10 minutes after the addition of rotenone. This shows that the cells differentiated with retinoic acid may have dopaminergic characteristics.

Further characterization of the membrane channels is examined via dopamine and nicotine. Dopamine is found to affect the current proving dopamine receptors on the site of RA differentiated cells. It caused a decrease in the inward current. There are at least 4 types of high threshold $Ca^{2+}$ channels that can be inhibited by γ-aminobutyric acid -B (GABAB) receptor agonists. These channels can be also inhibited by dopamine. $Ca^{2+}$ current is necessary for the activation of $Ca^{2+}$ dependent K+ channels. In the electrophysiological results, a decrease in the $K^+$ current can be observed further proving the decrease in the inward current is due to dopamine sensitive $Ca^{2+}$ ion channels.

The nicotinic acetylcholine receptors are examined via applying nicotine on the patch-clamp medium. To prevent signal differences that can stem from different cells, the sealed cells are subjected to the chemicals. The experiments are carried out with RA differentiated neuroblastoma cells. It shows that the cell line is not highly sensitive to nicotine, considering the concentration of nicotine and its response compared with dopamine sensitivity. However, a small increase in the inward current can be observed as opposed to outward current. This shows that the RA differentiated SHSY-5Y cells do not contain so much ACh receptors, but only a few.

**References:**

Armstrong, Lucas C., et al. "High-throughput patch clamp screening in human α6-containing nicotinic acetylcholine receptors." SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D 22.6 (2017): 686-695.

Dani, J. A.; Heinemann, S. Molecular and Cellular Aspects of Nicotine Abuse. Neuron 1996, 16, 905–908.

Freestone, Peter S., et al. "Acute action of rotenone on nigral dopaminergic neurons–involvement of reactive oxygen species and disruption of Ca2+ homeostasis." European Journal of Neuroscience 30.10 (2009): 1849-1859.

Halitzchi, F., L. Jianu, and B. Amuzescu. "ELECTROPHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY STUDY OF A HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINE." Romanian Reports in Physics 67.2 (2015): 439-451.

Inden, Masatoshi, et al. "Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice." Biological and Pharmaceutical Bulletin 34.1 (2011): 92-96.

J. L. Biedler, L. Helson, and B. A. Spengler, "Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture," Cancer Res., vol. 33, pp. 2643–2652 (1973).

Kovalevich, Jane, and Dianne Langford. "Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology." Neuronal Cell Culture. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. 9-21.

Missale, Cristina, et al. "Dopamine receptors: from structure to function." Physiological reviews 78.1 (1998): 189-225.

Påhlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E., & Esscher, T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbolester-induced differentiation. Cell Differentiation. 14 (2), 135–144 (1984).

Xie, H., Hu, L., & Li, G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chinese Medical Journal. 123 (8), 1086–1092, doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021 (2010).

Surmeier, D. J., and S. T. Kitai. "D~ 1 and D~ 2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons." Progress in brain research 99 (1993): 309-309.

Tuesta, L. M.; Fowler, C. D.; Kenny, P. J. Recent Advances in Understanding Nicotinic Receptor Signaling Mechanisms That Regulate Drug Self-Administration Behavior. Biochem. Pharmacol. 2011, 82, 984–995.

# Coronene surface as alpha radiation binder

Caglar CELIK BAYAR*

*Zonguldak Bulent Ecevit University, Faculty of Engineering, Department of Metallurgical and Materials Engineering, Zonguldak, Turkey.

*Corresponding author e-mail: caglarbayar@gmail.com, caglarbayar@beun.edu.tr

## Abstract

Coronene consisting of six peri-fused benzene rings is a polycyclic aromatic hydrocarbon and known as superbenzene. It is produced in the petroleum-refining process of hydrocracking and generally used in graphene synthesis. It serves as an interesting organic material with its aromatic property since it is a planar circulene including high π-conjugation. Therefore, it was thought to have a great potential of capturing hazardous alpha radiation in the present study. The coronene molecule optimized at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level had a point group of $D_{6h}$. It had potentially two benzene rings which could interact with an alpha particle ($He^{2+}$) in a long-range; the central ring ($R_1$) and one of the neighboring rings ($R_2$). The interaction of $He^{2+}$ and coronene central ring was abbreviated as $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ complex whereas that of the neighboring ring as $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ complex in which C represents the coronene molecule. $[C\text{-}R_2\ldots He]^{2+}$ complex was thermodynamically more stable than $[C\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ complex. The stabilities were directly in relation with the rings' NICS(1) aromaticity values. Central ring aromaticity value appeared lower than that of the neighboring ring. The interaction energies were exothermic for both complexes however, the formation of $[C\text{-}R_2\ldots He]^{2+}$ complex was more exothermic than that of $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ complex. According to the frontier molecular orbital analysis performed at the same theoretical level: a) Both complexes were found to be softer than coronene in terms of reactivity. b) The complexes both had more electrophilic character than coronene. c) The complexes were more resistant to oxidation than coronene.

**Keywords:** Coronene, Alpha radiation, DFT, M06-2X, NICS(1), BSSE.

## INTRODUCTION

Coronene (Figure 1), known as superbenzene, is a polycyclic aromatic hydrocarbon consisting of six peri-fused benzene rings (Fetzer and Winefordner, 2000). It is a yellow solid which is embedded in a very rare sedimentary rock mineral called carpathite. It forms needle-like crystals with a monoclinic structure. The γ form exists as the most stable polymorph while β form can also be produced in an applied magnetic field (Potticary et al., 2016) or in a way of performing phase transition from γ by decreasing the temperature at 158 K (Salzillo et al., 2018). It can be dissolved in common organic solvents like benzene, toluene and dichloromethane. Its solutions emit blue light fluorescence under UV light. It is produced in the petroleum-refining process of hydrocracking and generally used in graphene synthesis. If it is evaporated onto a copper surface at 1000 ° C, after a while graphene lattice appears onto a surface (Wan et al., 2013).

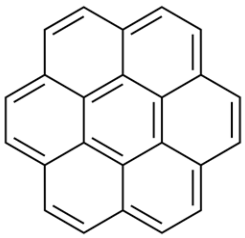


**Figure 1.** The chemical structure of coronene molecule.

An alpha particle ($He^{2+}$), structurally equivalent to the nucleus of a helium atom, consists of two protons and two neutrons. During the process of nuclear decay, the liberated energy (decay energy) is shared between the daughter nucleus and the alpha particle. The two neutrons of an alpha particle give it additional mass that further facilitates ionization by coulombic interaction or even direct collision of the alpha particle with atomic electrons. Alpha particles as well as other types of charged particles dissipate their energy during these collisions mainly by two mechanisms: ionization and electron excitation. The high mass and charge of an alpha particle, relative to other forms of nuclear radiation, give it greater ionization power but a poorer ability to penetrate matter (L'Annunziata, 2007).

Coronene, which is a planar circulene including high π-conjugation and serves as an interesting organic material with its aromatic property, was thought to have a great potential of capturing hazardous alpha radiation and to be oxidized consequently, in the present study. The coronene molecule had a high symmetry with a point group of $D_{6h}$. It had potentially two benzene rings which could interact with an alpha particle ($He^{2+}$) in a long-range; the central ring ($R_1$) and one of the neighboring rings ($R_2$) (Figure 1). The interaction of $He^{2+}$ and coronene central ring was abbreviated as $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ complex whereas that of the neighboring ring as $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ complex in which C represents the coronene molecule. Such a study did not exist neither experimentally nor theoretically in the literature. Therefore, it revealed the originality of the work.

## METHOD

A density functional, M06-2X, developed by Zhao and Truhlar (Zhao and Truhlar, 2008) provides an accurate description of the noncovalent interactions and is a hybrid functional with 54% Hartree-Fock exchange. Therefore, this functional was chosen for the evaluation of the complexes studied in this work. All the calculations were performed in the gas phase using Gaussian 09 program software (Frisch et al., 2009). The structure optimizations were performed at DFT M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory. The interaction energies of both complexes were calculated using the same level of theory and corrected with basis set superposition error (BSSE) contributions (Ebrahimi et al., 2014) after performing the pre-optimizations at semi-empirical and Hartree-Fock levels. BSSE corrections use the Boys and Bernardi counterpoise technique (Ebrahimi et al., 2014) which are due to overlap of the wave functions of the moieties (Mottishaw and Sun, 2013). The calculations of the considered complexes contained zero point energy corrections and had no imaginary frequencies which indicated that they stood for no transition states or saddle points on the potential energy surfaces.

The diamagnetic and paramagnetic effects of ring currents related to aromaticity and anti-aromaticity can be gauged by Nucleus Independent Chemical Shift (NICS) criterion (Schleyer et al., 1996). The NMR calculations were performed at DFT M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory using Gauge Independent Atomic Orbital (GIAO) method (Ebrahimi et al., 2014). Since NICS at 1 Å above the centre of the ring, NICS(1), was recommended as a better aromaticity diagnostic than the NICS(0) (NICS at the center of the ring) (Ebrahimi et al., 2014), NICS(1) calculations were performed for the considered complexes.

## RESULTS and DISCUSSION

### Total Electronic Energy and Interaction Energy Calculations

The total electronic energies of the complexes were presented in Table 1. $[Coronene\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ complex was found to be 220 cal/mol less stable than $[Coronene\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ complex, thermodynamically. Note that the interaction distances of the rings and $He^{2+}$ were almost the same for the two complexes (d $[C\text{-}R_1\ldots He^{2+}]$ = 2.76 Å, d $[C\text{-}R_2\ldots He^{2+}]$ = 2.77 Å).

**Table 1.** The total electronic energies of the complexes calculated at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level

| | $E_{tot} = E^0$+ZPE (au) | $E_{rel}$ (au) | $E_{rel}$ (kcal/mol) |
|---|---|---|---|
| $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ | -923.50289 | 0.00000 | 0.000 |
| $[C\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ | -923.50254 | 0.00035 | 0.220 |

Interaction energy is a valid way of measuring the stability and strength of a complex (Yuan et al., 2014). It is denoted as $E_{int} = E(A\text{-}B) - [E(A) + E(B)]$ in case of a A-B complex formation from the fragments of A and B. The BSSE corrected interaction energies of the complexes were listed in Table 2. The interaction energies were both exothermic (-1392.186 kcal and -1392.404 kcal for $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ and $[C\text{-}R_2\ldots He]^{2+}$ complexes,

respectively) which indicated that the formation of $[C\text{-}R_2\ldots He]^{2+}$ complex was 218 cal/mol more exothermic (stable) than that of $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ complex.

**Table 2.** The BSSE corrected interaction energies of the complexes calculated at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level

| | $E_{tot} = E^0$+ZPE (au) | $E_{BSSE}$ (au) | $E_{int}$ (au) | $E_{int}$ (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|
| Coronene | -921.28387 | | | |
| $He^{2+}$ | 0.00000 | | | |
| $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ | -923.50289 | 0.000051024 | -2.21897 | -1392.404 |
| $[C\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ | -923.50254 | 0.000047143 | -2.21862 | -1392.186 |

**NICS(1) Aromaticity Analyses**

Both the considered rings of coronene, $C\text{-}R_1$ (central ring) and $C\text{-}R_2$ (neighboring ring), were aromatic but $C\text{-}R_2$ NICS(1) value was more negative than that of $C\text{-}R_1$ (Table 3). It indicated that $C\text{-}R_2$ was more aromatic than $C\text{-}R_1$ since the more negative NICS values implied the more aromaticity (Schleyer et al., 1996).

**Table 3.** NICS(1) (ppm) values of $C\text{-}R_1$ and $C\text{-}R_2$ rings calculated at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level

| Ring | NICS(1) (ppm) |
|---|---|
| $C\text{-}R_1$ | -3.68 |
| $C\text{-}R_2$ | -11.95 |

**Frontier Molecular Orbitals, Reactivities and Stabilities**

Mulliken electronegativity ($\chi_M$), electronic chemical potential ($\mu$), absolute hardness ($\eta$), global softness (S), electrophilicity index ($\omega$) and $f_{H/L}$ index are important properties to understand the chemical reactivity of the compounds. They are obtained according to the equations (1) - (5) below:

$\chi_M = -\mu = (I + A) / 2$ (1) (Pearson, 1997)

$\eta = (I - A) / 2$ (2) (Singh et al., 2004)

$S = 1 / (2\,\eta)$ (3) (Singh et al., 2004)

$\omega = \mu^2 / (2\,\eta)$ (4) (Parr et al., 1999)

$f_{H/L} = \varepsilon_{HOMO} / \varepsilon_{LUMO}$ (5) (Rokhina and Suri, 2012)

I and A are the ionization potential and electron affinity, respectively (Pearson, 1997). Note that $I = -\varepsilon_{HOMO}$ and $A = -\varepsilon_{LUMO}$ within the validity of the Koopmans' theorem (Koopmans, 1934), where $\varepsilon_{HOMO}$ and $\varepsilon_{LUMO}$ are the energies of the highest occupied molecular orbital and lowest unoccupied molecular orbital, respectively.

According to the frontier molecular orbital analyses performed at the same theoretical level (Table 4): a) Both complexes were found to be softer than coronene in terms of reactivity ($S_{Complexes} = 10.68\ eV^{-1}$, $S_{Coronene} = 4.66\ eV^{-1}$) which specified that the complexes had more tendency to give a chemical reaction with a softer specie than coronene. In parallel, coronene was found to be harder than the considered complexes ($\eta_{Coronene} = 0.11$ eV, $\eta_{Complexes} = 0.047$ eV). b) The complexes both had more electrophilic character than coronene ($\omega_{Complexes} = 0.0054$ eV, $\omega_{Coronene} = 0.0011$ eV) which supported the reactivity phenomena described in "a". c) The complexes were more resistant to oxidation than coronene which were obtained by computing the $f_{H/L}$ indexes ($f_{H/L(Complexes)} = 1.22$; $f_{H/L(Coronene)} = 6.89$). Note that the species which has the lower $f_{H/L}$ index show more persistent character to oxidation than the species which has the higher $f_{H/L}$ index (Rokhina and Suri, 2012).

**Table 4.** The reactivities and stabilities of coronene and the considered complexes calculated at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level

| | η (eV) | S ($eV^{-1}$) | ω (eV) | $f_{H/L}$ |
|---|---|---|---|---|
| Coronene | 0.11 | 4.66 | 0.0011 | 6.89 |
| $[C\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ | 0.047 | 10.68 | 0.0054 | 1.22 |
| $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ | 0.047 | 10.68 | 0.0054 | 1.22 |

## CONCLUSION

The conclusion of this study were listed with some major outcomes:
1. It was concluded that coronene might serve as an efficient surface for alpha particle capturing by both of its rings $R_1$ and $R_2$, but predominantly by $R_2$, thermodynamically ($R_1$: central ring, $R_2$: neighboring ring).
2. The reactivity and stability predictions through the frontier molecular orbital analyses provided to conclude that the considered coronene-alpha particle complexes were softer than coronene which denoted that the complexes had more potential to react with a softer specie. They had more electrophilic character implying that they were more active towards a chemical reaction with a nucleophile. Additionally, they showed more persistent character to oxidation than coronene since coronene was already oxidized with an alpha particle in both complexes.
3. The possible interactions of coronene and alpha particle were evaluated within the limitation of the method and basis set used. However, it was possible to do relative comparisons.

## ACKNOWLEDGEMENT

The author would like to thank to Zonguldak Bulent Ecevit University Scientific Research Projects Coordination Office for financial support (Project No. BAP-2016-73338635-02).

## REFERENCES

Ebrahimi A, Karimi P, Akher FB, Behazin R, Mostafavi N 2014. Investigation of the π-π stacking interactions without direct electrostatic effects of substituents: The aromatic‖aromatic and aromatic‖anti-aromatic complexes. Molecular Physics, 112(7): 1047-1056.

Fetzer JC, Winefordner JD 2000. Large (C> = 24) polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry and analysis. New York: Wiley, 304 pp.

Frisch MJ, Trucks WG, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, et al. 2009. Gaussian 09, Revision A.02. Wallingford CT: Gaussian, Inc.

Koopmans T 1934. Über die zuordnung von wellenfunktionen und eigenwerten zu den einzelnen elektronen eines atoms [About the assignment of wave functions and eigenvalues to the individual electrons of an atom]. Physica, 1(1-6): 104-113.

L'Annunziata MF 2007. Radioactivity: Introduction and history. Amsterdam: Elsevier Science, 632 pp.

Mottishaw JD, Sun H 2013. Effects of aromatic trifluoromethylation, fluorination, and methylation on intermolecular π-π interactions. The Journal of Physical Chemistry A, 117(33): 7970-7979.

Parr RG, Szentpály Lv, Liu S 1999. Electrophilicity index. Journal of the American Chemical Society, 121(9): 1922-1924.

Pearson RG 1997. Chemical hardness: Applications from molecules to solids. Weinheim: Wiley-VCH, 208 pp.

Potticary J, Terry LR, Bell C, Papanikolopoulos AN, Christianen PCM, Engelkamp H, Collins AM, Fontanesi C, Kociok-Köhn G, Crampin S, et al. 2016. An unforeseen polymorph of coronene by the application of magnetic fields during crystal growth. Nature Communications, 7(11555): 1-7.

Rokhina EV, Suri RPS 2012. Application of density functional theory (DFT) to study the properties and degradation of natural estrogen hormones with chemical oxidizers. Science of the Total Environment, 417-418: 280-290.

Salzillo T, Giunchi A, Masino M, Bedoya-Martínez N, Valle RGD, Brillante A, Girlando A, Venuti E 2018. An alternative strategy to polymorph recognition at work: The emblematic case of coronene. Crystal Growth & Design, 18(9): 4869-4873.

Schleyer PvR, Maerker C, Dransfeld A, Jiao H, van Eikema Hommes NJR 1996. Nucleus-independent chemical shifts: A simple and efficient aromaticity probe. Journal of the American Chemical Society, 118(26): 6317-6318.

Singh PP, Srivastava HK, Pasha FA 2004. DFT-based QSAR study of testosterone and its derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12(1): 171-177.

Wan X, Chen K, Du J, Liu D, Chen J, Lai X, Xie W, Xu J 2013. Enhanced performance and fermi-level estimation of coronene-derived graphene transistors on self-assembled monolayer modified substrates in large areas. The Journal of Physical Chemistry C, 117(9): 4800-4807.

Yuan K, Guo Y-J, Yang T, Dang J-S, Zhao P, Li Q-Z, Zhao X 2014. Theoretical insights into the host-guest interactions between [6]cycloparaphenyleneacetylene and its anthracene-containing derivative and fullerene $C_{70}$. Journal of Physical Organic Chemistry, 27(10): 772-782.

Zhao Y, Truhlar DG 2008. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. Theoretical Chemistry Accounts, 120(1-3): 215-241.

# Değişik oranlarda poliakrilonitril ve karbon elyaf takviyeli geri dönüşümlü polipropilen polimer kompozitlerinin mekanik değerlerdeki değişimlerin incelenmesi

Şükran GÜNEY[1] Münir TAŞDEMİR[2]

[1] Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Metalurji ve Malzeme Müh.Istanbul 34722, Türkiye
[2]Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fak.,Metalurji ve Malzeme Müh. Böl. Istanbul 34722, Türkiye

sukranguney95@gmail.com

## Özet

Bu çalışmada iki ayrı polimer kompozitinin özellikleri araştırılmıştır. Bunlar geri dönüşümlü polipropilen(R-PP)/poliakrilonitril (PAN) ve geri dönüşümlü polipropilen (R-PP)/karbon elyaf polimer kompozitleridir. PAN ve karbon elyaf matris içerisine %10-20 ve 30 oranlarında katılmıştır. Matris ve elyaf arasında adezyonun sağlanması için %5 oranında sisteme maleik anhidrit aşılı polipropilen (MAPP) katılmıştır. Öncelikle tüm malzemeler ektrüzyon öncesinde yirmi dört saat boyunca etüvde kurutulmuş ve daha sonra ektrüzyon işlemine geçirilerek malzemeler karıştırılmıştır. Burada homojen bir karışım elde edebilmek için çift vidalı bir ekstrüzyon tercih edilmiştir. Ekstrüzyon işlemi sonrasında tüm granür grupları tekrar kurutulmuş ve enjeksiyon makinesinde standart test numuneleri basılmıştır. Elde edilen deney numunelerinden ilgili standartlar kullanılarak mekanik testler yapılmıştır. Çekme testinde karbon elyaf ve poliakrilonitriloranınınartışı ile elastiklik modülü, çekme mukavemeti, kopma mukavemeti ve kopma uzama değerlerindeki değişimler tespit edilmiştir. Karbon elyaf oranının artmasıyla elastiklik modülü, çekme mukavemeti ve kopma mukavemeti değerlerinin arttığı görülmüştür. Aynı şekilde poliakrilonitril ilavesi ile de bu değerlerin arttığı tespit edilmiştir. Ama poliakrilonitrilde karbon elyafa oranla daha az bir artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık kopma uzama değerinin ise karbon elyaf ve poliakrilonitril ilavesiyle düştüğü tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra Shore sertlik, çentikli Izod darbe mukavemeti ve yoğunluk değerleri de belirlenmiştir. Burada da karbon elyaf oranının artmasıyla sertlik, darbe mukavemeti ve yoğunluk değerlerinin artığı görülmüştür. Poliakrilonitril oranının artması ile de bu değerlerde karbon elyaftan daha az bir artış olduğu tespit edilmiştir. Karbon elyaf ve poliakrilonitrilin homojen dağılıp dağılmadığını ve maleik anhidrit polipropilen bağlayıcı olarak etkisini belirlemek için taramalı elektron mikroskobisi ile kırık yüzey fotoğrafları da çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardan karbon elyafın ve poliakrilonitrilin homojen olarak dağıldığı ve maleik anhidrit polipropilen ise ara yüzeyde etkili olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:**Geri dönüşümlü polipropilen, mekanik özellikler, karbon elyaf, poliakrilonitril

# Investigation of changes in mechanical values of polyacrylonitrile and carbon fiber reinforced recycled polypropylene polymer composites in different proportions

## Abstract

In this study, properties of two separate polymer composites were investigated. These are recycled polypropylene (R-PP) / polyacrylonitrile (PAN) and recycled polypropylene (R-PP) / carbon fiber polymer composites. It has been added to PAN and carbon fiber matrix at the rates of 10-20 and 30%. Maleic anhydride grafted polypropylene (MAPP) was added to the 5% system to ensure adhesion between the matrix and fiber. Firstly, all materials were dried in the oven for twenty-four hours before extrusion, and then the materials were mixed by being extruded. Here, a twin screw extrusion was preferred to obtain a homogeneous mixture. After the extrusion process, all the granule groups were dried again and standard test samples were printed on the injection machine. Mechanical tests were carried out using the relevant standards from the test samples obtained. In the tensile test, changes in the elasticity modulus, tensile strength, tensile strength and tensile elongation values were determined with the increase of carbon fiber and polyacrylonitriloran. It has been

observed that the elasticity modulus, tensile strength and tensile strength values increase with increasing carbon fiber ratio. Similarly, it was found that these values increased with the addition of polyacrylonitrile. However, a less increase was observed in polyacrylonitrile compared to carbon fiber. On the other hand, it has been determined that the breaking elongation value decreases with the addition of carbon fiber and polyacrylonitrile. In addition, Shore hardness, notched Izod impact strength and density values were determined. Here, it has been observed that the hardness, impact strength and density values increase with increasing carbon fiber ratio. It has been determined that with the increase of polyacrylonitrile ratio, there is less increase in these values than carbon fiber. Broken surface photographs were also taken by scanning electron microscopy to determine whether carbon fiber and polyacrylonitrile are homogeneously dispersed and its effect as a maleichydride polypropylene binder. From the photographs taken, it was determined that carbon fiber and polyacrylonitrile are distributed homogeneously and maleic anhydride polypropylene is effective at the interface.

**Keywords:**Recycledpolypropylene, mechanicalproperties, carbon fiber, polyacrylonitrile

## 1. GİRİŞ

Kompozit malzemeler, sağladıkları avantajlar ve çeşitlilikleri dolayısı ile uygulama alanlarında istenilen bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri tek başına karşılayamayan polimerlerin çeşitli tipte ve oranlarda tekstil lifleri ile desteklenmesi sonucunda istenilen özellikleri sağlayabilen kompozit yapıların elde edilmesi, yaygın olarak uygulanmaktadır. Polimer matrisli kompozit malzemeler; kompozit malzemelerin en önemli ve en çok kullanılan türlerinden biridir. Bu kompozitler; matris malzemesi olarak epoksi, polyester ve vinil ester gibi reçineler ile cam, aramid ve karbon elyaf gibi takviye malzemelerinin birleştirilmesi sonucunda üstün özellikler gösteren malzemelerdir (Post, 2017). Sürekli fiber takviyesi yapılarak polimer matrisli kompozitler güçlendirilebilir. Fiber olarak aramid, karbon, cam, akrilik vb. kullanılabilir (Gurbanov,2018).Polimerler atık olarak doğaya atıldıklarında, bozunma sıcaklıklarının yüksek olması, ultroviyole ışınlarına dayanıklı olması, doğadaki bakterilere karşı dayanıklı olması onların uzun süre bozunmadan kalmalarına sebeptir. Bu sebepten dolayı çevreyi kirlettiklerinden "geri dönüşümleri" bir toplumsal zorunluluktur (Ay, 2008). Bu çalışmada geri dönüşümlü malzemeler kullanılmıştır. Polipropilen, ambalajdan, oyuncaklardan, borulardan ve aletlerden elektronik, uçak ve otomotiv endüstrilerinde umut vaat eden bazı özel uygulamalara kadar günlük yaşamımızda çeşitli uygulamalara sahiptir. Polipropilen uygulamaları enjeksiyonla kalıplanmış, üflemeli kalıplanmış ürünlerden, elyaflardan ve filamanlardan filmlere ve ekstrüzyon kaplamalarına kadar uzanmaktadır (Güneysu, 2014). Bunun sonucu olarak da yeni materyallerin üretilmesi veya mevcut materyallerin özelliklerinin iyileştirilmesi üzerine çalışmalara başvurulmaktadır. Karbon elyaf takviye edilerek gelişimi ve uygulanabilirliğinin sağlanması ile kullanım alanı genişlemiştir. Bu elyaf takviyesinden sonra yüksek mukavemet elde edilmektedir. Akrilik liflerin kimyasal dayanımları ve ısıl kararlılıkları iyidir (Walsh, 2001). Plastik enjeksiyon prosesinde kalıp tasarımının üretilecek parçanın şeklini oluşturmak dışında, malzemenin fiziksel özellikleri üzerinde de ciddi etkileri bulunmaktadır. Parça yüzeylerinde oluşan gerilmeler, çöküntüler, eksenlere göre değişkenlik gösteren boyut çekmeleri kalıp tasarımı sırasında dikkate alınmaktadır. Literatürde bazı araştırmacılar geri dönüşümlü polipropilen, karbon elyaf ve poliakrilonitrilin polimer karışımları içerinde ne tür özellik gösterdiğini belirleme konusunda çalışmalar yapmıştır. M.H. Akonda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; Kıyılmış geri dönüştürülmüş karbon elyafı (R-CF), geri dönüşümlü polipropilen(R-PP) ile karıştırmışlar ve termoplastik bir kompozit elde etmişlerdir. Bu oluşturdukları kompozit numuneleriyle bazı mekanik testleri incelemişlerdir. R-PP/R-CF kompozitinin mekanik özelliklerinde, çekme mukavemetinin, çekme modülünün ve elastiklik modülünün karbon elyaf oranı arttıkça arttığı tespit edilmiştir (Akonda ve ark., 2012). Chien-Lin Huang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise; farklı karbonlu malzemelerin farklı ölçümlerle takviye edebileceği kompozitlerin Polipropilen(PP)/Grafen(GN) ve Polipropilen(PP)/Karbon elyaf(CF) mekanik, kristalleşme ve elektromanyetik özellikleri incelenmiştir.PP / CF iletken kompozitinin mekanik özelliklerinde, çekme mukavemetinin ilk önce azaldığı daha sonra karbon elyaf oranı arttıkça arttığı tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2015). LienZhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; yüksek yoğunluklu polietilen(HDPE)/poliakrilonitril (PAN) kompozitleri çift vidalı ekstruder ile eritilip karıştırılarak, test için numuneler bir enjeksiyon kalıplama kullanılarak yapılmıştır. Sertlik ve elastiklikmodülü PAN ilavesiyle arttığı görülmüştür. PAN polietilenin yüksek çekme dayananımı ve deformasyona karşı koyma kabiliyetini arttırdığı tespit edilmiştir(Zhu ve ark.,2015).Emanuel Meshoyrer ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada; geri dönüşümlü polieter eter keton(PEEK)/karbon elyaf (R-CF) ve PEEK/karbon elyaf (CF) polimer kompozitleri üsttün karıştırma sağlamak için bir enjeksiyon kalıplama makinesi kullanılarak numuneler elde edilip mekanik morfolojik, ısıl özellikleri ve elektrik iletkenliği incelenmiştir. Karbon elyaf oranı arttıkça darbe dayanımının arttığı tespit edilmiştir (Meshoyrer ve ark., 2019). Bu deneysel çalışmada karbon elyaf ve poliakrilonitrilin ayrı ayrı geri dönüşümlü polipropilen ile karışımlarından elde edilen sonuçların malzemenin özelliklerinde geliştirici bir özellik göstermesi incelenmiştir.

## 2.METARYAL VE METOT

### 2.1 Kompozisyon ve Malzemeler

Yedi farklı polimer kompoziti hazırlandı.HazırlananR-PP/Karbon Elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin karışım oranları Tablo 1'de verilmiştir. Geri dönüşümlü polipropilen (Emoplen CP-M 8081) EMAŞ'tan temin edildi. Yoğunluğu 0,95 g/cm$^3$'tür. Erime akış indisi 8,99 g/10 dak (230 $^o$C, 2,16 Kg)'dır. Isıl çarpılma sıcaklığı ise (0,45 MPa) 56,4$^o$C'dir. Bu deneysel çalışmada kullanılan atık poliakrilonitril ve karbon elyaf Epiriler Tekstil A.Ş. Firmasından temin edilmiştir. Firma ticari kaygılarından dolayı kullandığı PAN'ın ve karbon elyafın ürün değerlerini vermemiştir. Aşağıdaki tabloda bu çalışmada kullanılan malzemelerin oranları verilmiştir.

**Tablo 1.** R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin karışım oranları

| Gruplar | Geri dönüşümlü polipropilen (%) | Poliakrilonitril (%) | Karbon elyaf (%) | Maleik anhidrit polipropilen (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 100 | - | | |
| 2 | 85 | 10 | | 5 |
| 3 | 75 | 20 | | 5 |
| 4 | 65 | 30 | | 5 |
| 5 | 85 | - | 10 | 5 |
| 6 | 75 | - | 20 | 5 |
| 7 | 65 | - | 30 | 5 |

### 2.2 Numune Hazırlama

Değişik oranlardaki karbon elyaf ve poliakrilonitril takviyeli geri dönüşümlü polipropilen polimer kompozitleri 24 saat boyunca 105 $^o$C sıcaklıktaki etüvde kurutuldu. Ekstrüzyon öncesinde granüller LB-5601 isimli katı karıştırıcıda (ThePatterson-KelleyCo.,Inc., USA) 15 dakika boyunca karıştırıldı. Değişik oranlardaki polimer kompozitleri Mikrosan marka çift vidalı bir ekstrüzyon makinesinde (Mikrosan Makine A.Ş., Türkiye) 180-220 $^o$C sıcaklık aralığında 15 Bar basınç altında ve 25 dev/dak'lık hızla dönen vida ile eriyik olarak karıştırıldı ve granül haline getirildi. Bu granüller tekrar 24 saat boyunca 105 $^o$C sıcaklıktaki etüvde kurutuldu. Daha sonra kurutulan granüllerden test numuneleri enjeksiyon makinasında basıldı. Enjeksiyon sıcaklığı 180-220 $^o$C, enjeksiyon basıncı 90-110 bar ve vida dönme hızı 25 dev/dak.

**Tablo 2.**R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin ekstrüzyon ve enjeksiyon şartları

| İşlem | Ekstrüzyon | Enjeksiyon |
|---|---|---|
| Sıcaklık (°C) | 180–220 | 180–220 |
| Basınç (bar) | 15 | 90–110 |
| Kalıpta bekleme süresi (sn) | - | 20 |
| Vida hızı (dev/dak) | 25 | 25 |
| Kalıp sıcaklığı (°C ) | - | 40 |

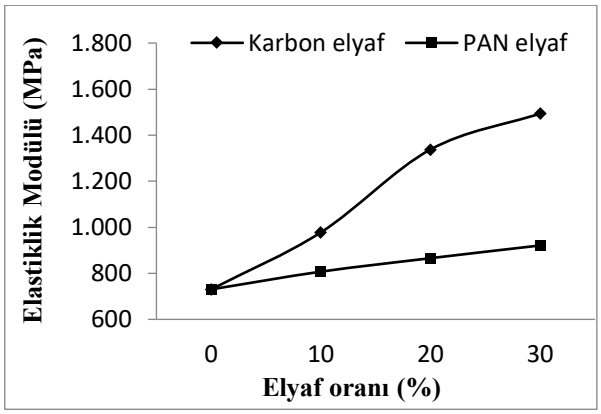
### 2.3 Test Yöntemi

Çekme testleri ASTM D638 standardına göre yapıldı. 10 kN kapasiteli Zwick Z010 (Almanya) marka çekme test cihazında 50 mm/dak.'lık çekme hızı kullanıldı. Dolayısıyla elastik modülü, çekme mukavemeti, kopma mukavemeti ve kopma uzama değerleri bu test cihazı ile elde edildi. Her gruptan beş adet numune kullanıldı ve ortalama değerleri alındı. Sertlik testi, Zwick sertlik ölçüm cihazı ile ASTM D2240 standardına göre yapıldı. Darbe mukavemetini belirlemek için Zwick B5113 darbe test cihazı kullanıldı. ASTM D256 yöntemine göre oda sıcaklığında ve numunelere çentik açılarak gerçekleştirildi. Yoğunluk testi ISO 2781 test standardına göre yapıldı. R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin SEM analizleri için tüm numuneler Polaron SC7640 (İngiltere) kaplama cihazı ile 20 Å kalınlığında altın/paladyum alaşımı ile kaplanmıştır. Daha sonra FEI Sirion XL30 FEG (Hollanda) marka elektron mikroskobisi ile 10kV voltaj altında fotoğrafları çekilmiştir.

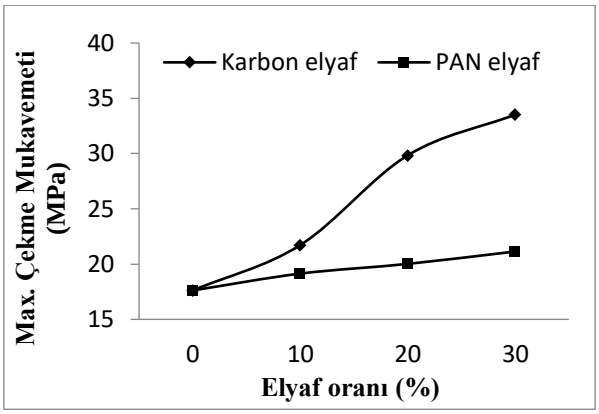
## 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 3.1 R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin mekanik değerleri:

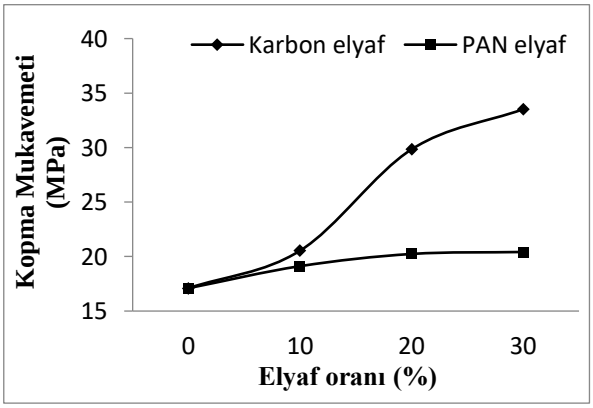
Geri dönüşümlü polipropilene karbon elyaf ve poliakrilonitril ilavesiyle oluşturulun polimer kompozitlerinin mekanik değerlerdeki değişimi Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1-A'da da görüldüğü gibi karbon elyaf ve poliakrilonitril oranlarının artması ile elastiklik modül değerinin de arttığı görülmektedir.Saf polipropilenin elastiktik modülü değeri 730,4 MPa olarak ölçülmüştür. Çalışma grupları içerisinde tespit edilen en yüksek değer yedinci gruba aittir ve 1494 MPa olarak ölçülmüştür. En yüksek değerin elde edildiği grup en yüksek karbon elyaf oranını içermektedir. Saf geri dönüşümlü PP'nin (R-PP) elastiklik modülü değerini %30 karbon elyaf ilaveli R-PP 'nin elastiklik modülü değeri ile kıyasladığımızda %104,5'lik bir artış tespit edilmiştir. Şekil 1-A incelendiğinde, karbon elyafın PAN'a göre elastik modülünü daha çok arttırdığı gözlemlenmiştir. Sistem içerisindeki elyaf oranları numunelerin gevrekliğini arttırmıştır.Şekil 1-B ve C'de de görüldüğü gibi karbon elyaf ve poliakrilonitril oranlarının artması ile çekme mukavemeti ve kopma mukavemeti değerinin de arttığı görülmektedir.Saf PP'nin çekme mukavemeti değeri 17,62 MPa olarak tespit edilmiştir. En yüksek çekme mukavemeti değerini %30 karbon elyaf ilaveli grup vermiştir. Saf geri dönüşümlü PP'nin (R-PP) çekme mukavemeti değerini %30 karbon elyaf ilaveli R-PP'nin çekme mukavemeti değeri ile kıyasladığımızda %90'lık bir artış tespit edilmiştir. Çekme mukavemetindeki bu artış elyafın polipropilene göre daha gevrek bir malzeme olması ile açıklanabilir.


Elastiklik Modülü (MPa)
1.800
1.600
1.400
1.200
1.000
800
600
Karbon elyaf
PAN elyaf
0
10
20
30
Elyaf oranı (%)

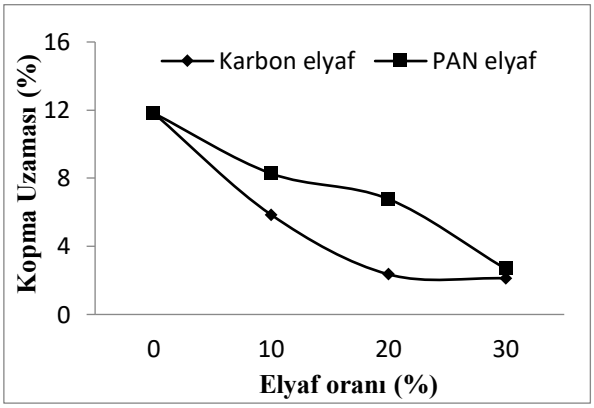
A


Max. Çekme Mukavemeti (MPa)
40
35
30
25
20
15
Karbon elyaf
PAN elyaf
0
10
20
30
Elyaf oranı (%)

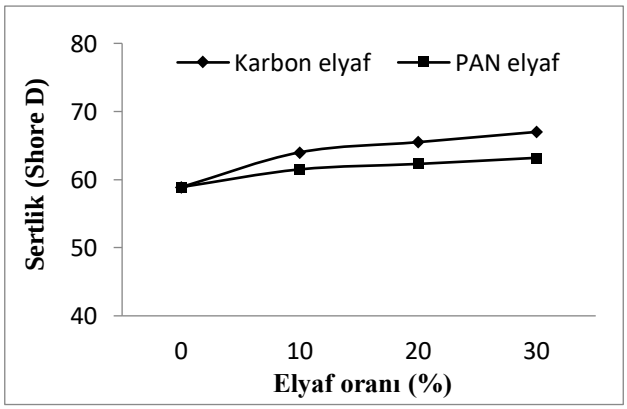
B


Kopma Mukavemeti (MPa)
40
35
30
25
20
15
Karbon elyaf
PAN elyaf
0
10
20
30
Elyaf oranı (%)

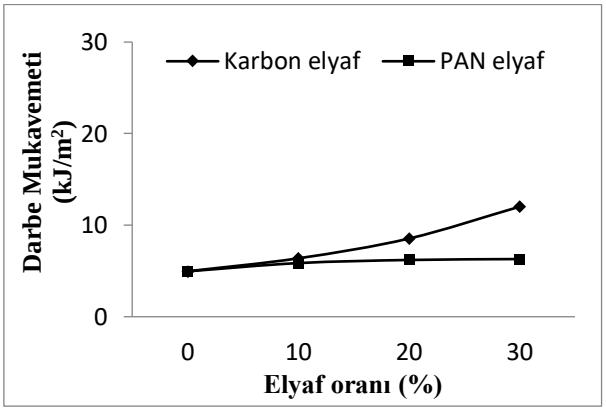
C


Kopma Uzaması (%)
16
12
8
4
0
Karbon elyaf
PAN elyaf
0
10
20
30
Elyaf oranı (%)

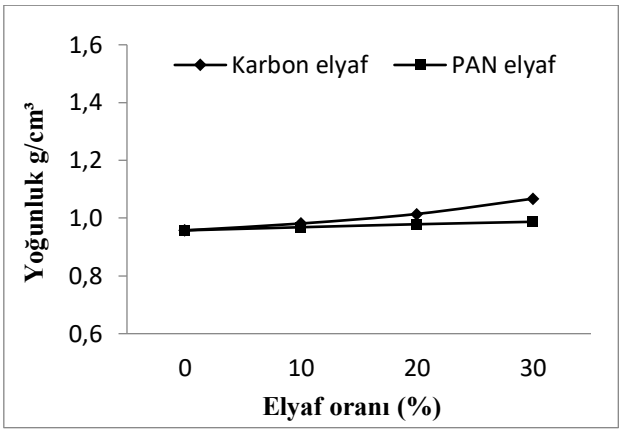
D


Sertlik (Shore D)
80
70
60
50
40
Karbon elyaf
PAN elyaf
0
10
20
30
Elyaf oranı (%)

E


Darbe Mukavemeti (kJ/m2)
30
20
10
0
Karbon elyaf
PAN elyaf
0
10
20
30
Elyaf oranı (%)

F




G

**Şekil 1.** R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin mekanik özellikleri

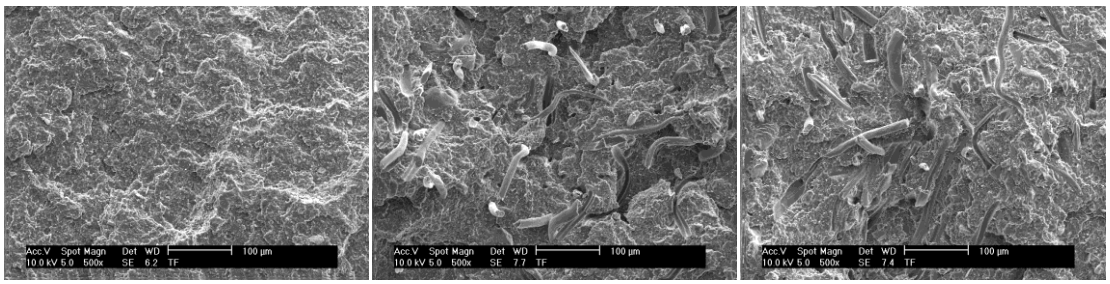
Şekil 1-C'de çekme testi sonucunda elde edilen kopma mukavemeti değerlerine göre en yüksek sonuç yedinci çalışma grubunun olup 33,52 MPa olarak ölçülmüştür. Saf geri dönüşümlü PP'nin (R-PP) kopma mukavemeti değerini %30 karbon elyaf ilaveli R-PP 'nin kopma mukavemeti değeri ile kıyasladığımızda %96,02'lik bir artış tespit edilmiştir. Elastiklik modülü ve çekme mukavemeti verilerinde olduğu gibi, kopma mukavemeti sonuçlarında da en düşük değere sahip grup 17,1 MPa değeri ile saf polipropilenin olmuştur.

Şekil 1-D'ye baktığımızda kompozit içerisinde artan elyaf oranları, kopma uzama miktarında düşüşe yol açmıştır. En yüksek kopma uzama miktarına %11,82 ile saf polipropilenin sahip olduğu tespit edilmişken, kompozit içerisinde artan elyaf oranı kopma uzama miktarını azalttığı ve en düşük kopma uzama miktarının %2,12 uzama oranı ile en yüksek karbon elyaf içeren yedinci grupta olduğu belirlenmiştir. Kompozit içerisinde artan iki elyaf oranları da neredeyse aynı düzeyde malzemenin kopma uzamasında düşüş görülmektedir. Elde edilen bu verilere göre malzeme içerisinde artan elyaf oranının polimer kompozitinin sünekliliğini azalttığı yani malzemenin kalıcı şekil değiştirme yeteneğini zorlaştırdığı gözlemlenmiştir.

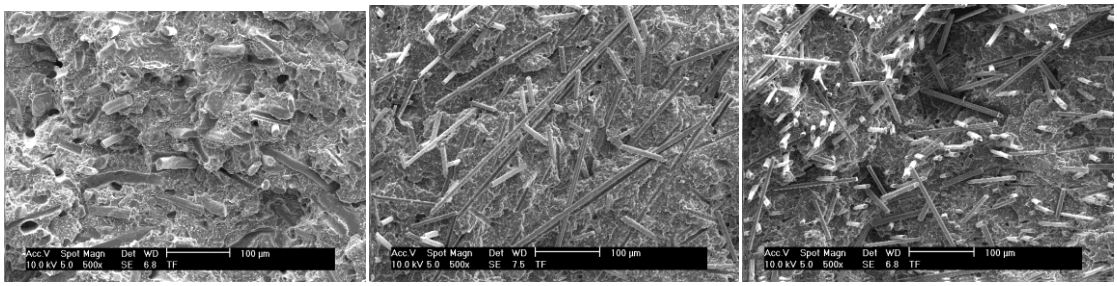
Şekil 1-E incelendiğinde kompozit içerisinde artan elyaf oranı malzeme sertliğini arttırmıştır. Saf polipropilenin sertliği 58,9 Shore D ölçülmüşken, en yüksek karbon elyaf oranlı olan yedinci grubun sertliği 67,0 Shore D ölçülerek çalışma grupları arasında en yüksek sertlik değeri elde edilmiştir. Karbon elyaf oranı PAN'a göre sertlikte daha çok artışa sebep olurken iki elyaf oranı da artıkça lineer bir şekilde sertlikte artış gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, kompozit içerisinde artan elyaf oranının malzemenin sertliğini arttırdığı, PAN'nın karbon elyafa göre biraz daha yumuşak bir yapısının olması PP'nin sertlik artış oranını etkilemiştir. Şekil 1-F'de polimer kompozitleri içerisinde elyaf oranının artmasıyla birlikte darbe mukavemeti saf polipropilene göre yükselmiştir. Gruplar içerisindeki Karbon elyaf oranının artmasıyla birlikte darbe mukavemetinin PAN'a göre daha çok arttığı tespit edilmiştir. Saf polipropilenin darbe mukavvemet değeri 4,96 kJ/m$^2$olarak ölçülmüştür. Son çalışma grubu olan ve %30 oranında karbon elyaf içeren yedinci gruba ait darbe mukavemeti ise 12,02 kJ/m$^2$ olarak ölçülürken, dördüncü gruba ait ve %30 oranında PAN içeren kompozitimizin darbe mukavemeti 6,30kJ/m$^2$olarak tespit edilmiştir. Şekil 1-G'ye baktığımızda gerçekleştirilen ölçümler sonrasında saf polipropilenin yoğunluk değeri 0,9576 g/cm$^3$ iken içerisine %10 karbon elyaf ilavesiyle bu değerin 0,9814 g/cm$^3$ olduğu görülmektedir. %20 karbon elyaf ilavesiyle 1,0144 g/cm$^3$ ve %30 karbon elyaf ilavesi ile de bu değerin 1,0673 g/cm$^3$'e çıktığı tespit edilmiştir. En yüksek artışın %30 karbon elyaf ilavesinde olduğu görülmektedir. Buna karşılık PAN ilaveli gruplarda %10 da 0,9685g/cm$^3$, %20 de 0,9788 g/cm$^3$ ve %30 da 0,9873g/cm$^3$ değerleri tespit edilmiştir. Yani iki elyaf miktarının artışıyla da yoğunluğun artmasına rağmen karbon elyafta daha belirgin bir artış söz konusudur.

### 3.2 R-PP/Karbon Elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin mikroyapı incelemesi:

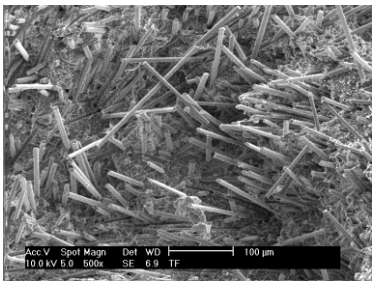
R-PP/karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin mikroyapı fotoğrafları Şekil 2'de verilmiştir. Polipropilen matris içerisinde karbon elyafların ve poliakrilonitrilin homojen olarak dağıldığı fotoğraflardan açıkça görülmektedir.



1. Grup 2. Grup 3. Grup



4. Grup 5. Grup 6. Grup



7. Grup

**Şekil 2.** R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin SEM fotoğrafları

## 4. SONUÇ

Bu çalışmada geri dönüşümlü polipropilen polimerine farklı oranlarda karbon elyaf ve poliakrilonitril katarak elde edilen polimer kompozitinin elastiklik modülü, çekme mukavemeti, kopma mukavemeti, kopma uzaması, sertlik değeri, çentikli Izod darbe mukavemeti, yoğunluk değerleri ve mikroyapı özellikleri incelenmiş olup karbon elyafın ve poliakrilonitril ilavesiyle değerlerde önemli değişimlerin olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre:

1. Geri dönüşümlü polipropilene karbon elyaf ve poliakrilonitril ilavesi ile elastiklik modülü, akma mukavemeti, kopma mukavemeti, sertlik değeri, çentikli Izod darbe mukavemeti ve yoğunluk değerleri artmıştır. Bu artışın sebebi elyafların rijit yapısından kaynaklanmaktadır. Fakat PAN ilavesi karbon elyafa oranla daha az miktarda artışa sebep olmuştur.
2. Geri dönüşümlü polipropilene karbon elyaf ve poliakrilonitril ilavesi kopma uzama değerinde bir düşüş sağlamıştır. Elyaf oranının polimer kompozitinin sünekliliğini azalttığı yani malzemenin kalıcı şekil değiştirme yeteneğini zorlaştırdığı gözlemlenmiştir.
3. Mikroyapı fotoğraflarından anlaşıldığı gibi karbon ve poliakrilonitril elyaf homojen olarak dağılmıştır.

**Teşekkür**

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: FEN-C-YLP-100719-0252)

**KAYNAKLAR**

Akonda,M.H., Lawrence, C.A., Weager, B.M., (2012). Recycled Carbon Fibre-Reinforced Polypropylene Thermoplastic Composite. Science Direct, 43, 79-86

Ay,İ.,(2008). Polimer Malzemelerin İşlenme Teknikleri Ders Notu. Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye.

Gurbanov, N., (2018). Farklı Tip Fiber Takviyeli HDPE Matrisli Polimer KompozitlerinTribolojik Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Türkiye.

Güneysu, H., (2014). Effects of Anti-Scratch Additives on The Properties of Polypropylenes. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Huang, C.,Lou, C., Liu, C.F., Song, X.M., andHorngLi, J., (2015). Polypropylene/Grapheneand Polypropylene/Carbon Fiber Conductive Composites: Mechanical, Crystallization and Electromagnetic Propertie. Applied Sciences, 5, 1196-1210

Meshoyrer E.,Pan C., Yao B., Zhang J.,, Dr., Lync J,. Chang E., (2019). Development of Polymer Composites Reinforced with Recycled Carbon Fibers. New Jersey'sGovernor's School of Engineering and Technology.

Post, W., et al.(2017). "Healing of a glass fibre reinforced composite with a disulphide containing organic-inorganic epoxy matrix." Composites Science and Technology, 152: 85-93.

Walsh P.J., (2001. CarbonFibers, ASM Handbook, 21, 35-40

Zhu K.,Wu D., Wang B., Zhao J., Jin, Z., Zhao, K., (2017). Reinforcing high-density polyethylene bypolyacrylonitrile fibers. ResearchPaper, Pigment &ResinTechnology,

# Poliakrilonitril ve karbon elyaf takviyeli geri dönüşümlü polipropilen polimer kompozitlerinin fiziksel özelliklerinin incelenmesi

Şükran GÜNEY[1] Münir TAŞDEMİR[2]
[1] Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Metalurji ve Malzeme Müh.Istanbul 34722, Türkiye
[2]Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fak.,Metalurji ve Malzeme Müh. Böl. Istanbul 34722, Türkiye

sukranguney95@gmail.com

## Özet

Bu çalışmada iki ayrı polimer kompozitinin özellikleri araştırılmıştır. Bunlar geri dönüşümlü polipropilen(R-PP)/poliakrilonitril (PAN) ve geri dönüşümlü polipropilen (R-PP)/karbon elyaf polimer kompozitleridir. PAN ve karbon elyaf matris içerisine %10-20 ve 30 oranlarında katılmıştır. Matris ve elyaf arasında adezyonun sağlanması için %5 oranında sisteme maleik anhidrit aşılı polipropilen (MAPP) katılmıştır. Öncelikle tüm malzemeler ektrüzyon öncesinde yirmi dört saat boyunca etüvde kurutulmuş ve daha sonra ektrüzyon işlemine geçirilerek malzemeler karıştırılmıştır. Burada homojen bir karışım elde edebilmek için çift vidalı bir ekstrüzyon tercih edilmiştir. Ekstrüzyon işlemi sonrasında tüm granür grupları tekrar kurutulmuş ve enjeksiyon makinesinde standart test numuneleri basılmıştır. Elde edilen deney numunelerinden ilgili standartlar kullanılarak fiziksel özelliklerini belirlemek için testler yapılmıştır.Vicat yumuşama sıcaklığı, ısıl çarpılma sıcaklığı, erime akış indisi ve nem emme miktarı belirlenmiştir. Karbon elyaf oranının artmasıyla vicat yumuşama sıcaklığı, ısıl çarpılma sıcaklığı değerlerinin arttığı görülmüştür. Aynı şekilde poliakrilonitril ilavesi ile de bu değerlerin arttığı tespit edilmiştir. Ama poliakrilonitrilde karbon elyafa oranla daha az bir artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık erime akış indeksi ve nem tayini değerinin ise karbon elyaf ve poliakrilonitril ilavesiyle düştüğü tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak 20-40-60 ve 80 metrede aşınma oranları belirlenmiştir. Aynı zamanda değişik yükler altında (100, 200, 300, 400 ve 500 gr) statik sürtünme kat sayıları belirlenmiştir. Karbon elyaf ve poliakrilonitrilin artmasıyla aşınma oranında artış tespit edilmiştir. Sürtünme katsayısı belirleme testinde yükün artmasıyla bir azalış olduğu görülmüştür. Karbon elyaf ve poliakrilonitrilin homojen dağılıp dağılmadığını ve maleik anhidrit polipropilen bağlayıcı olarak etkisini belirlemek için taramalı elektron mikroskobisi ile kırık yüzey fotoğrafları da çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardan karbon elyafın ve poliakrilonitrilin homojen olarak dağıldığı ve maleik anhidrit polipropilen ise ara yüzeyde etkili olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:**Geri dönüşümlü polipropilen, fiziksel özellikler, karbon elyaf, poliakrilonitril

# Investigation of the physical properties of polyacrylonitrile and carbon fiber reinforced recycled polypropylene polymer composites

## Abstract

In this study, properties of two separate polymer composites were investigated. These are recycled polypropylene (R-PP) / polyacrylonitrile (PAN) and recycled polypropylene (R-PP) / carbon fiber polymer composites. It has been added to PAN and carbon fiber matrix at the rates of 10-20 and 30%. Maleic anhydride grafted polypropylene (MAPP) was added to the system at a rate of 5% to ensure adhesion between the matrix and fiber. First, all the materials were dried in the oven for twenty-four hours before extrusion, and then the materials were mixed by being extruded. Here, a twin screw extrusion was preferred to obtain a homogeneous mixture. After the extrusion process, all the granule groups were dried again and standard test samples were printed on the injection machine. Tests were conducted to determine the physical properties of the obtained test samples using the relevant standards. The softening temperature, thermal distortion temperature, melting flow index and moisture absorption amount were determined. It has been observed that with the increase of the carbon fiber ratio, the values of vicat softening temperature and thermal distortion temperature increase. Similarly, it was found that these values increased with the addition of polyacrylonitrile. However, a less increase was observed in polyacrylonitrile compared to carbon fiber. On the other hand, it was determined that the melting flow index and moisture determination value decreased with the addition of carbon fiber and

polyacrylonitrile. In addition, wear rates were determined at 20-40-60 and 80 meters. At the same time, static friction coefficients were determined under different loads (100, 200, 300, 400 and 500 g). With the increase of carbon fiber and polyacrylonitrile, an increase in wear rate was detected. In the friction coefficient determination test, a decrease was observed with the increase of the load. Broken surface photographs were also taken by scanning electron microscopy to determine whether carbon fiber and polyacrylonitrile are homogeneously dispersed and its effect as a maleic anhydride polypropylene binder. From the photos taken, it was determined that carbon fiber and polyacrylonitrile are homogeneously distributed and maleic anhydride polypropylene is effective on the interface.
**Keywords:** Recycled polypropylene, physical properties, carbon fiber, polyacrylonitrile

## 1. GİRİŞ

Uygulama alanlarında istenilen bazı fiziksel ve/veya kimyasal özellikleri tek başına karşılayamayan polimerlerin çeşitli tipte ve oranlarda tekstil lifleri ile desteklenmesi sonucunda istenilen özellikleri sağlayabilen kompozit yapıların elde edilmesi, son zamanlarda yaygın olarak uygulanan bir yöntemdir. Matris kompozit malzemelerin yapısında meydana gelen gerilmelerin karşılanmasına yardımcı olarak, liflerde meydana gelen çatlama ve kopmaları önleyerek tok bir yapı oluşturur. Kompozit malzemelerde basınç dayanımı matris malzemesinin dayanımına bağlıdır. Matris malzemeleri ıslatıcılık özelliği ve şekillendirilebilme kolaylığı nedeniyle sıvı halde kullanılır. Matrisin akışkanlık direnci önemlidir. Kompozit malzeme kullanılarak yapılacak imalatta matrisin kimyasal özelliği, ısıl direnci, kürleme süresi ve ekonomik değeri gibi unsurlar belirleyicidir (Ersoy,2001; Şahin,2000; Saçak,2002; Olcay ve ark.,2002).Elyaf takviyeli kompozitler; kompozit malzemelerin en yaygın türü elyaf takviyeli kompozitlerdir. Lif takviyeli kompozit malzemelerde bileşen malzemeler, moleküler boyutta birbirinden farklıdırlar ve mekanik olarak birbirinden ayrılabilirler. Matris (reçineler) termoset veya termoplastik olabilir. Takviye lifleri, uzun liflerden, dokuma kumaş, kısa kesilmiş lifler vb. değişik formlarda olabilirler. Her biçim ayrı özelliklerle sonuçlanır. Kompozit malzemenin özellikleri, liflerin kompozit içerisinde nasıl uzandığına bağlıdır (Vasiliev ve ark.,2001). Bu çalışmada geri dönüşümlü malzemeler kullanılmıştır. Polipropilen uygulamaları enjeksiyonla kalıplanmış, üflemeli kalıplanmış ürünlerden, elyaflardan ve filamanlardan filmlere ve ekstrüzyon kaplamalarına kadar uzanmaktadır (Güneysu,2014). Karbon elyaf takviye edilerek gelişimi ve uygulanabilirliğinin sağlanması ile kullanım alanı genişlemiştir. Bu elyaf takviyesinden sonra yüksek mukavemet elde edilmektedir. Akrilik liflerin kimyasal dayanımları ve ısıl kararlılıkları iyidir (Walsh,2001). Plastik enjeksiyon prosesinde kalıp tasarımının üretilecek parçanın şeklini oluşturmak dışında, malzemenin fiziksel özellikleri üzerinde de ciddi etkileri bulunmaktadır. Parça yüzeylerinde oluşan gerilmeler, çöküntüler, eksenlere göre değişkenlik gösteren boyut çekmeleri kalıp tasarımı sırasında dikkate alınmaktadır.Literatürde bazı araştırmacılar polipropilen, karbon elyaf ve poliakrilonitril polimer kompozitlerinin özelliklerini belirleme konusunda çalışmalar yapmıştır (Akonda ve ark.,2012; Huang ve ark.,2015; Zhu ve ark.,2017; Meshoyrer ve ar.,2019). Mehmet Emin Demir ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (Demir ve ark.,2019), cam ve karbon elyaf takviyeli kompozit çubukların kuru kayma koşullarındaki abrasiv aşınmaları gerçekleştirmişlerdir. Pin on disk cihazında gerçekleştirilen deneylerde elyaf türünün, uygulanan yükün (5, 10 ve 15 N), kayma hızının(0,4; 0,6 ve 0,8 m/s) ve kayma mesafesinin(250, 500 ve 750 m) kompozitlerin tribolojik davranışlarına etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde karbon elyaf takviyeli kompozitlerdeki sürtünme katsayısının arttığı belirlenmiştir. Aşınmaya bağlı kütle kayıplarında, bütün koşullar için cam elyafta kütle kaybının daha az olduğu görülmüştür. Artan yük, kayma hızı ve mesafesinin kütle kaybını arttırdığı tespit edilmiştir. Denise Hirayama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Hirayama ve ark.,2017); kompozit atıklardan kaynaklanan karbon elyaflarının miktar ve boyutlarının yeni bir polipropilen matriks bileşiğine etkisini incelemişlerdir. Çalışmayı gerçekleştirmek için, geri dönüştürülmüş karbon elyaf iki farklı uzunlukta (4,5 mm ve 3,0 mm) doğranmış elyafların üretimi için mekanik olarak işlenmiştir. Lif ağırlığı muhtevasında %1, %5 ve%7 oranlarında doğranmış karbon fiber/polipropilenden termoplastik kompozitler, ekstrüzyon ve enjeksiyon işlemiyle elde edilmiştir. Daha sonra, elde edilen kompozit materyali karakterize etmek için bir dizi laboratuvar testi (mekanik, termal ve morfolojik) yapılmıştır. Geri dönüşümlü karbon fiber (R-CF) ilavesi erime akışını azaltma eğiliminde olduğu görülmüştür. Bu deneysel çalışmada geri dönüşümlü polipropilen(R-PP)/poliakrilonitril (PAN) ve geri dönüşümlü polipropilen (R-PP)/karbon elyaf polimer kompozitlerinin vicat yumuşama sıcaklığı,

ısıl çarpılma sıcaklığı, erime akış indisi, nem emme miktarı, aşınma oranı, statik sürtünme katsayısı değerleri ve morfolojileri incelenmiştir. Artan poliakrilonitril ve karbon elyaf oranları ile bu değerlerdeki değişimler tespit edilmiştir.

## 2.MATERYAL VE METOT

### 2.1 Kompozisyon ve Malzemeler

Yedi farklı polimer kompoziti hazırlandı.Hazırlanan R-PP/Karbon Elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin karışım oranları Tablo 1'de verilmiştir. Geri dönüşümlü polipropilen(Emoplen CP-M 8081) EMAŞ'tan temin edildi. Yoğunluğu 0,95 g/cm$^3$'tür. Erime akış indisi 8,99 g/10 dak (230 $^o$C, 2,16 Kg)'dır. Isıl çarpılma sıcaklığı ise (0,45 MPa) 56,4$^o$C'dir. Bu deneysel çalışmada kullanılan atık poliakrilonitril ve karbon elyaf Epiriler Tekstil A.Ş. Firmasından temin edilmiştir. Firma ticari kaygılarından dolayı kullandığı PAN'ın ve karbon elyafın ürün değerlerini vermemiştir. Aşağıdaki tabloda bu çalışmada kullanılan malzemelerin oranları verilmiştir.

**Tablo 1**. R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin karışım oranları

| Gruplar | Geri dönüşümlü polipropilen (%) | Poliakrilonitril (%) | Karbon elyaf (%) | Maleik anhidrit polipropilen (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 100 | - | | |
| 2 | 85 | 10 | | 5 |
| 3 | 75 | 20 | | 5 |
| 4 | 65 | 30 | | 5 |
| 5 | 85 | - | 10 | 5 |
| 6 | 75 | - | 20 | 5 |
| 7 | 65 | - | 30 | 5 |

### 2.2 Numune Hazırlama

Değişik oranlardaki karbon elyaf ve poliakrilonitril takviyeli geri dönüşümlü polipropilen polimer kompozitleri 24 saat boyunca 105 $^o$C sıcaklıktaki etüvde kurutuldu. Ekstrüzyon öncesinde granüller LB-5601 isimli katı karıştırıcıda (ThePatterson-KelleyCo.,Inc., USA) 15 dakika boyunca karıştırıldı. Değişik oranlardaki polimer kompozitleriMikrosan marka çift vidalı bir ekstrüzyon makinesinde (Mikrosan Makine A.Ş., Türkiye) 180-220 $^o$C sıcaklık aralığında 15 Bar basınç altında ve 25 dev/dak'lık hızla dönen vida ile eriyik olarak karıştırıldı ve granül haline getirildi. Bu granüller tekrar 24 saat boyunca 105 $^o$C sıcaklıktaki etüvde kurutuldu. Daha sonra kurutulan granüllerden test numuneleri enjeksiyon makinesinde basıldı. Enjeksiyon sıcaklığı 180-220 $^o$C, enjeksiyon basıncı 90-110 bar ve vida dönme hızı 25 dev/dak.

**Tablo 2**. R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin ekstrüzyon ve enjeksiyon şartları

| İşlem | Ekstrüzyon | Enjeksiyon |
|---|---|---|
| Sıcaklık ($^o$C) | 180–220 | 180–220 |
| Basınç (bar) | 15 | 90–110 |
| Kalıpta bekleme süresi (sn) | - | 20 |
| Vida hızı (dev/dak) | 25 | 25 |
| Kalıp sıcaklığı ($^o$C ) | - | 40 |

### 2.3 Test Yöntemi

Tüm grupların erime akış indisi testleri ISO 1133 test standardına göre Zwick 4100 MFI (Almanya) test cihazı ile yapıldı. Her gruptan üç ölçüm yapılmış olup ortalama değerleri verildi. Isıl çarpılma sıcaklığı ve Vicat yumuşama sıcaklıkları sırasıyla ISO 75 ve ISO 307 test standardına göre CEAST 6521 marka (CeastSpA, Italy) HDT-Vicat test cihazı ile yapıldı. Burada da her gruptan üçer adet numune test edilmiş ve ortalama değerleri verilmiştir. Nem emme davranışlarının belirlenmesi için ASTM D 6980 test standardı kullanılmıştır. Bu test Kern DBS 60-3 test cihazı ile yapılmıştır. Aşınma testleri DIN 53 516 test standardına göre Devotrans DA5 (Devotrans test cihazları- Türkiye) aşınma cihazında yapıldı. Her grup için üç numune kullanıldı ve ortalama değerleri verildi. Burada kullanılan numune kalınlığı 7 mm ve numune çapı ise 15,5mm'dir. Aşındırıcıdaki tamburun dönme hızı 40 dev/dak.'dır. Numuneye 10N'luk yük (F) uygulanmıştır. Aşındırma mesafeleri (L) ise 20-40-60 ve 80 m'dir. Numunelerdeki kütle kaybı (Δm) aşınma işleminden sonra ölçülmüş ve spesifik aşınma oranları (Ws) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Ws=(\Delta m) / \rho.F_N.L \ (mm^3/Nm) \quad (1)$$

Burada (ρ) numunenin yoğunluğu, ($F_N$) uygulanan yük ve (L) ise kayma mesafesidir.

Statik sürtünme katsayısının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır. Her gruptan üç adet numune test edilmiş ve ortalama değerleri verilmiştir. Burada ($F_s$) sitatik sürtünme kuvveti, ($F_P$) normal kuvvet ve ($\mu s$) ise statik sürtünme katsayısıdır.

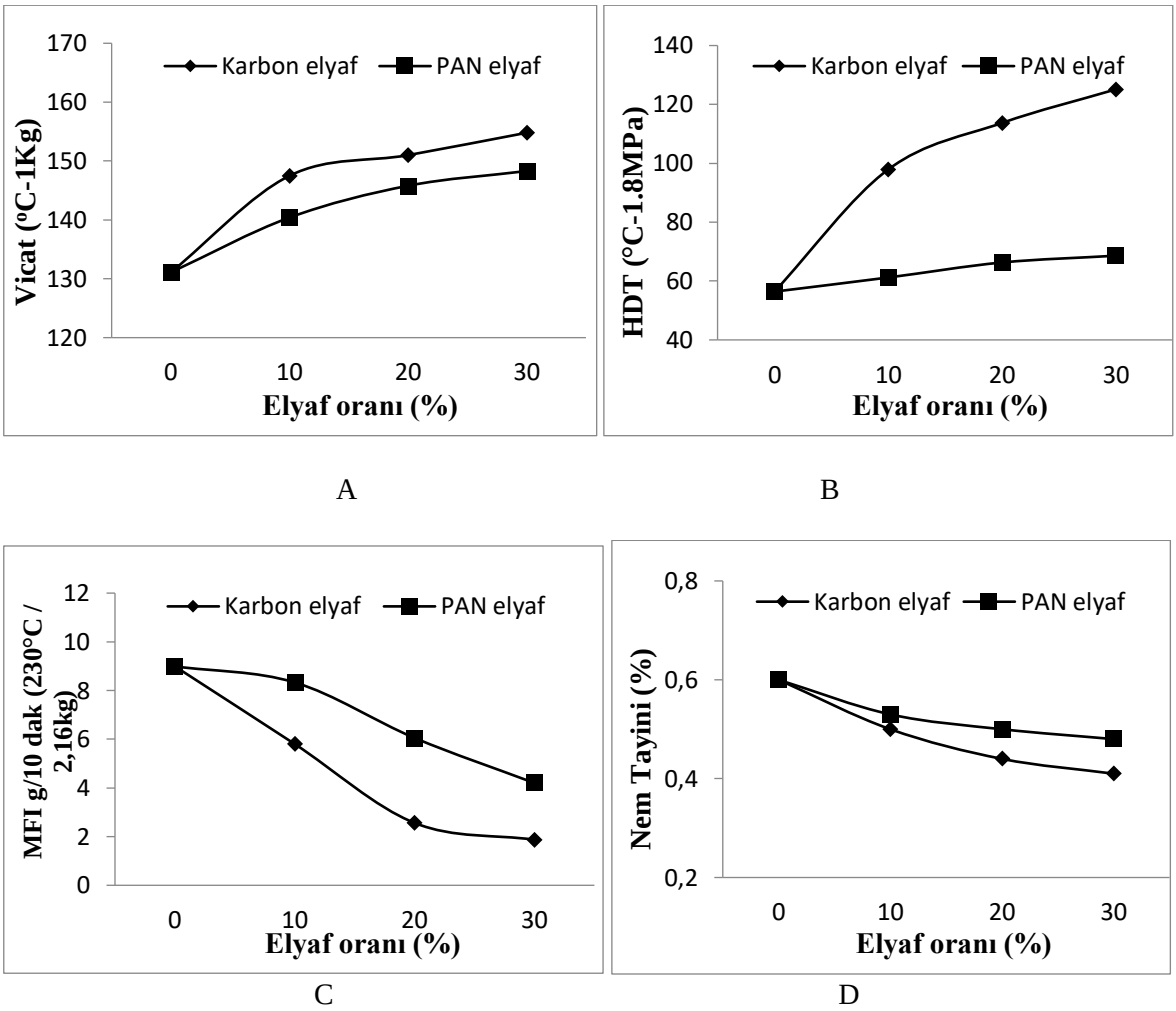
$$\mu s=F_S/F_P \quad (2)$$

R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin SEM analizleri için tüm numuneler Polaron SC7640 (İngiltere) kaplama cihazı ile 20 Å kalınlığında altın/paladyum alaşımı ile kaplanmıştır. Daha sonra FEI Sirion XL30 FEG (Hollanda) marka elektron mikroskobisi ile 5 kV voltaj altında fotoğrafları çekilmiştir.

## 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 3.1 R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitinin fiziksel özellikleri:

Polipropilene karbon elyaf ve poliakrilonitril ilavesiyle oluşturulun polimer kompozitinin fiziksel değerlerdeki değişimi Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1-A'da da görüldüğü gibi elyaf oranının artması ile vicat yumuşama sıcaklıklarının arttığı görülmektedir. Fakat karbon elyafın yoğunluğunun fazla olması nedeniyle PAN'a göre vicat sıcaklığı daha yüksek tespit edildiği görülmektedir. Saf polipropilenin vicat yumuşama sıcaklık değeri 131,0°C iken içerisine %30 PAN ilavesiyle bu değerin 148,3°C, %30 karbon elyaf ilavesiyle 154,8°C kadar çıktığı tespit edilmiştir. En yüksek artışın %30 karbon elyaf ilavesinde olduğu görülmektedir.Saf geri dönüşümlü PP'nin (R-PP) vicat yumuşama sıcaklığı değerini %30 karbon elyaf ilaveli R-PP'nin vicat yumuşama sıcaklığı değeri ile kıyasladığımızda %18,16'lık bir artış tespit edilmiştir. İki elyaf türünde de düzenli bir artış gözlenmektedir.



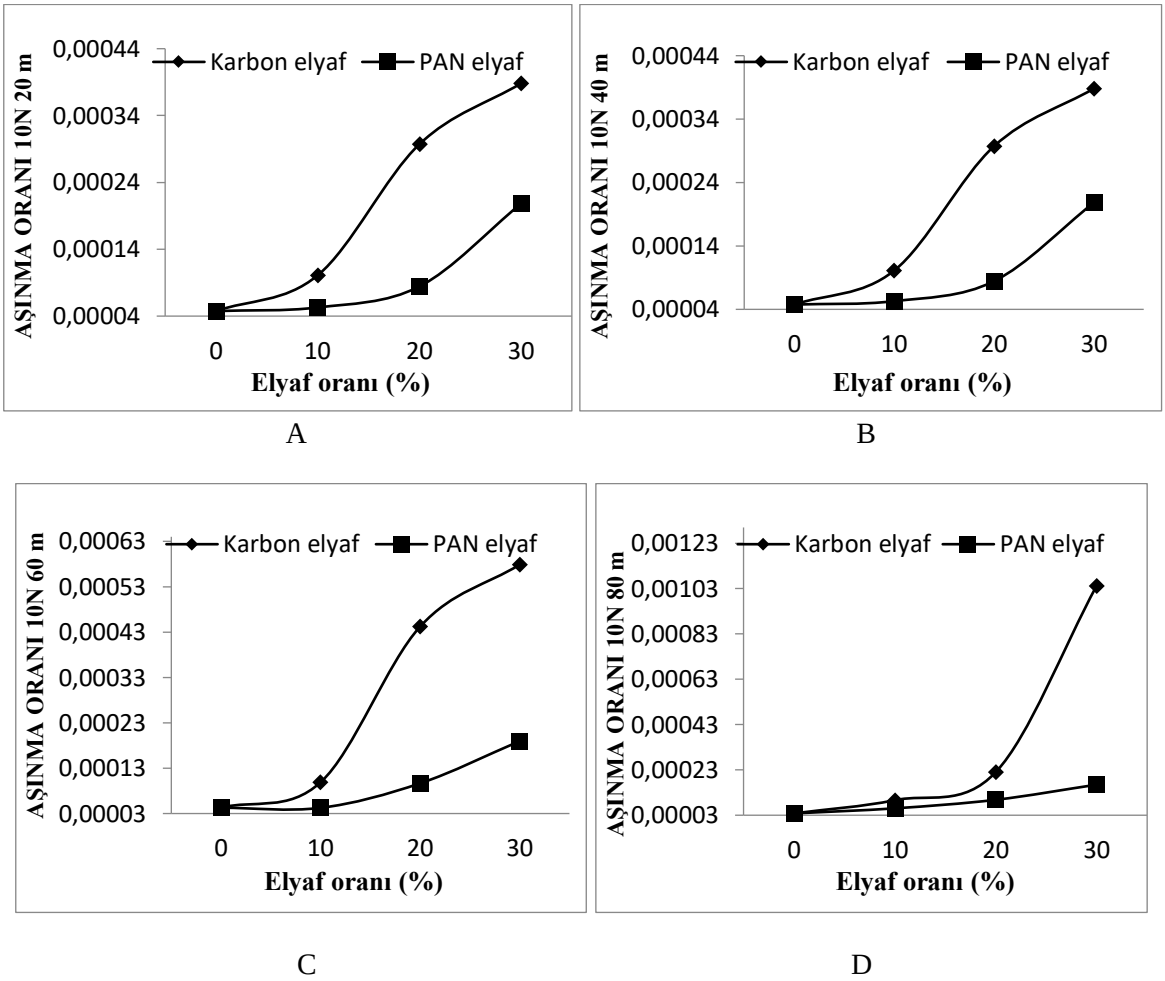

**Şekil 1**. R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin fiziksel özellikleri

Şekil 1-B'ye baktığımızda Saf polipropilene ait HDT değeri 56,4˚C olarak tespit edilmiştir. İçerisinden %30 oranında PAN ilavesi ile 68,6˚C, %30 Karbon elyaf ilavesiyle ise 125,1˚C olduğu tespit edilmiştir.Elyaf oranının artmasıyla bir artış gözükürken Karbon elyaf ilavesi ile en yüksek sıcaklığa ulaştığı görülmektedir. Saf geri dönüşümlü PP'nin (R-PP) ısıl çarpılma sıcaklığı değerini %30 karbon elyaf ilaveli R-PP'nin ısıl çarpılma sıcaklığı değeri ile kıyasladığımızda %121,8'lik bir artış tespit edilmiştir. Şekil 1-C'ye baktığımızda geri dönüşümlü polipropilene karbon elyaf ve PAN ilavesiyle erime akış indisi değerleri düşmüş fakat en düşük erime akış indisi değeri %30 karbon elyaf ilaveli grupta tespit edilmiştir. Saf geri dönüşümlü PP'nin (R-PP) MFI değerini %30 karbon elyaf ilaveli R-PP 'nin MFI değeri ile kıyasladığımızda %79,1'lik bir azalış tespit edilmiştir. Her iki elyaf için de oranlardaki artışla beraber düzenli bir düşüş söz konusudur.Şekil 1-D'ye baktığımızda elyaf oranının artmasıyla birlikte nem emme miktarında azalma tespit edilmiştir. Saf polipropilen içerisinde %0,60 oranında bulunan nem miktarının, %10 karbon elyaf ilavesiyle %0,50, %20 karbon elyaf ilavesiyle %0,44 ve %30 karbon elyaf ilavesiyle %0,41 oranlarında değiştiği tespit edilmiştir. En düşük nem emme miktarı %30 karbon elyaf içeren yedinci grupta ortaya çıkmıştır. Saf geri dönüşümlü PP'nin (R-PP) nem tayini değerini %30 karbon elyaf ilaveli R-PP 'nin nem tayini değeri ile kıyasladığımızda %31,6'lık bir azalış tespit edilmiştir. PAN ilavesinde ise %10'da %53, %20'de %50 ve %30'da %48 gibi bir düşüş söz konusudur.

### 3.2. R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin aşınma ve sürtünme davranışı:

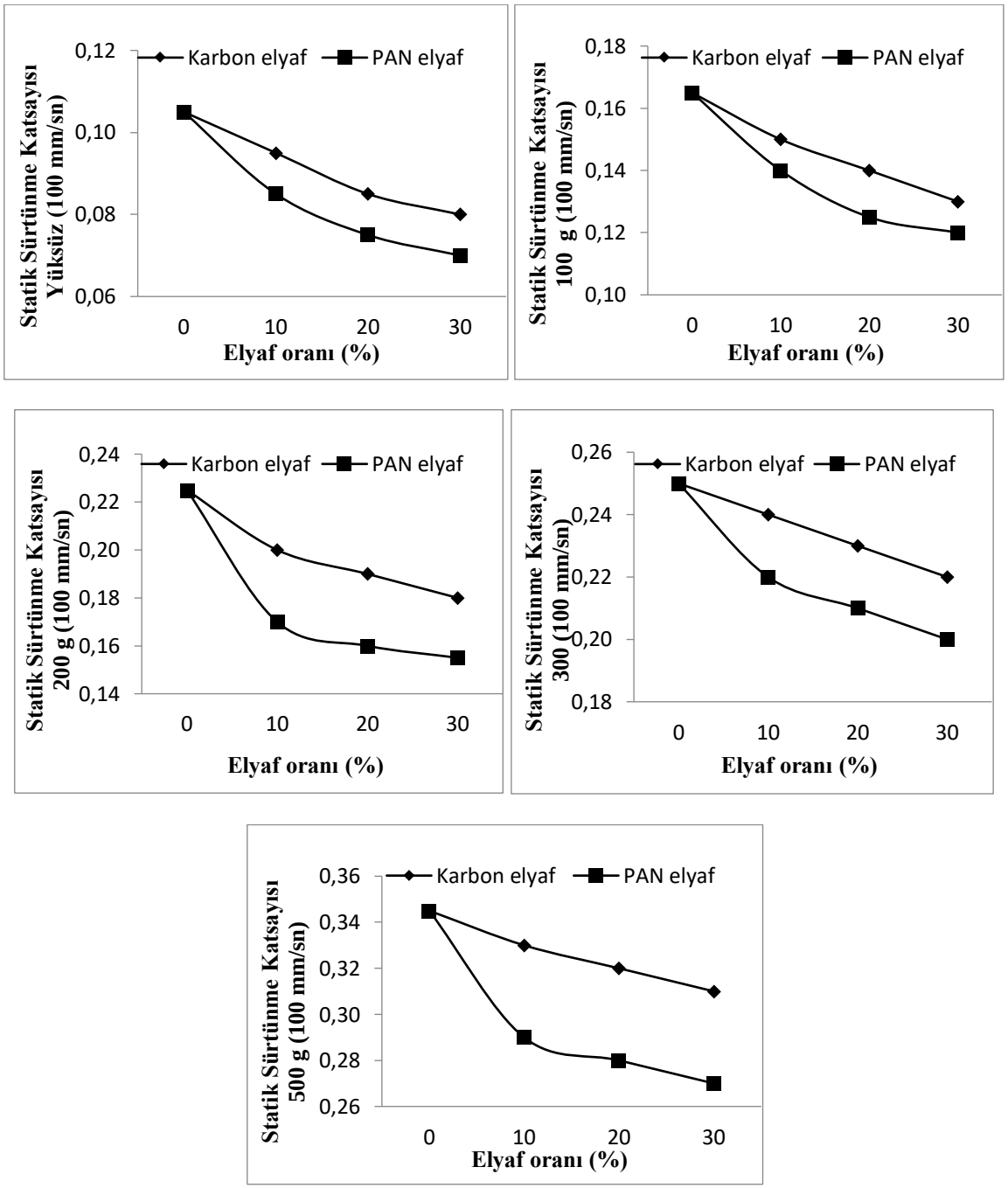
R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin aşınma davranışlarının incelenmesi amacıyla 10 N yük altında 0,32 m/s hızla dönen zımparalı(# 60) tambur üzerinde tüm numuneler 20-40-60 ve 80 metre aşındırılmıştır. Formül (1) kullanılarak değerler yerine girilmiş ve aşınma oranları hesaplanmıştır.

Aşınma oranı değerleri Şekil 2'de verilmiştir. Karbon elyaf ve poliakrilonitril oranlarının artmasıyla aşınma oranı değerlerinin de artığı görülmektedir. Aşınma mesafesinin artması da aşınma değerlerini etkileyen bir parametredir. Aşındırma mesafeleri arttıkça da aşınma oranlarının artığı görülmektedir.




**Şekil 2.** R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin aşınma oranları

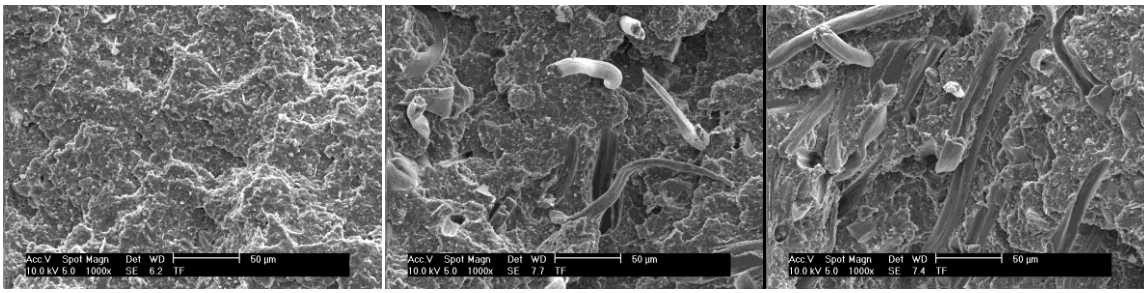
R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin sürtünme davranışlarının incelenmesi amacıyla değişik yükler altında (100, 200, 300, 400 ve 500 gr) numuneler 100 mm/dak'lık hız birbiri üzerinde kaydırılmış ve statik sürtünme katsayıları belirlenmiştir. Statik sürtünme katsayıları Şekil 3'de gösterilmiştir. Yükün, kompozitin statik sürtünme katsayısı üzerinde büyük bir etkisi olduğu görülmüştür. Yük arttıkça, tüm gruplardastatik sürtünme katsayılarının yükseldiği tespit edilmiştir. Buna karşılık Karbon elyaf ve PAN oranının artması ile de statik sürtünme katsayılarının düştüğü tespit edilmiştir.



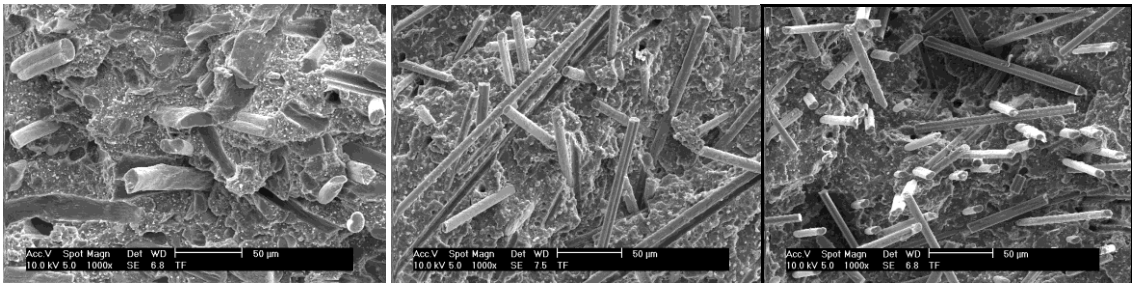

**Şekil 3.** R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin sürtünme katsayıları

### 3.3 R-PP/Karbon Elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin mikroyapı incelemesi:

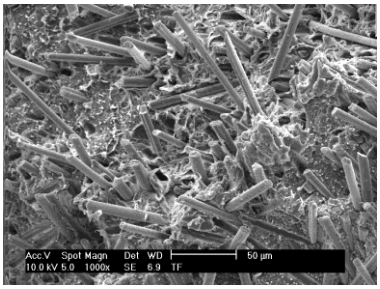
R-PP/karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin mikroyapı fotoğrafları Şekil 4'de verilmiştir. Polipropilen matris içerisinde karbon elyafların ve poliakrilonitrilin homojen olarak dağıldığı fotoğraflardan açıkça görülmektedir.



1. Grup 2. Grup 3. Grup



4. Grup 5. Grup 6. Grup



7. Grup

**Şekil 4.** R-PP/Karbon elyaf/MAPP ve R-PP/PAN/MAPP polimer kompozitlerinin SEM fotoğrafları

## 4. SONUÇ

Bu çalışmada polipropilen polimerine farklı oranlarda karbon elyaf ve poliakrilonitril katarak elde edilen polimer kompozitininvicatyumuşama sıcaklığı, ısıl çarpılma sıcaklığı, erime akış indisi, nem emme miktarı, aşınma oranı, statik sürtünme katsayısı ve mikroyapı özellikleri incelenmiş olup karbon elyaf ve karbon elyaf ilavesiyle değerlerde önemli değişimlerin olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre:

4. Geri dönüşümlü PolipropileneKarbon elyaf ve poliakrilonitrililavesi ile vicat yumuşama sıcaklığı, ısıl çarpılma sıcaklığı, ve aşınma oranı değerleri artmıştır. Bu artışın sebebi elyaflarınrijit yapısından kaynaklanmaktadır. Fakat PAN ilavesi karbon elyafa oranla daha az miktarda artışa sebep olmuştur.
5. Geri dönüşümlü polipropilene karbon elyaf ve poliakrilonitrililavesi erime akış indeksi ve nem emme değerlerini düşürmüştür.
6. Karbon elyaf vepoliakrilonitril oranlarının artmasıyla aşınma oranı değerlerinin de artığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak aşındırma mesafeleri arttıkça da aşınma oranlarının artığı görülmektedir.
7. Yük arttıkça, tüm gruplarda statik sürtünme katsayı değerleri artmıştır. Karbon elyaf ve poliakrilonitril oranının gruplar içerisindeki artışı statik sürtünme katsayılarının bir miktar düşmesine sebebiyet vermiştir.
8. Mikroyapı fotoğraflarından anlaşıldığı gibi karbon elyaflar ve poliakrilonitrillerhomojen olarak dağılmıştır.

**Teşekkür**

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: FEN-C-YLP-100719-0252)

**KAYNAKLAR**

Akonda,M.H., Lawrence, C.A., Weager, B.M., (2012). Recycled Carbon Fibre- Reinforced Polypropylene Thermoplastic Composite. Science Direct, 43, 79-86

Demir M. E., Çelik Y. H. ve Kılıçkap E., (2019). Cam ve Karbon Elyaf Takviyeli Kompozitlerde Elyaf Cinsinin, Yükün, Kayma Hızı ve Mesafesinin Abrasiv Aşınmaya Etkisi. Politeknik Dergisi, 22(4): 811-817.

Ersoy H. Y.,(2001). Kompozit Malzeme, Literatür Yayıncılık Dağıtım Pazarlama, San. Tic. Ltd.Şti. İSTANBUL

Güneysu, H., (2014). Effects of Anti-Scratch Additives on The Properties of Polypropylenes. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Hirayama, D.,Saronb C., Botelhoc, E.C., Costac, M.L., Juniora A.C.A., (2017). Polypropylene Composites Manufactured from Recycled Carbon Fibers from Aeronautic Materials Waste. Materials Research, 1980-5373

Huang, C.,Lou, C., Liu, C.F., Song, X.M., andHorngLi, J., (2015). Polypropylene/Grapheneand Polypropylene/Carbon Fiber Conductive Composites: Mechanical, Crystallization and Electromagnetic Propertie. AppliedSciences, 5, 1196- 1210

Meshoyrer E.,Pan C., Yao B., Zhang J.,, Dr., Lync J,. Chang E., (2019). Development of Polymer Composites Reinforced with Recycled Carbon Fibers. New Jersey'sGovernor's School of Engineeringand Technology.

Olcay Y., M.Akyol,R.GEMCİ,(2002). Polimer esaslı lif takviyeli kompozit malzemelerin arabirim mukavemeti üzerine farklı kür metodlarının incelenmesi: Uludağ Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 7(1) 93.

Saçak M.,(2002). Polimer Kimyası, GAZİ Kitabevi, ANKARA

Şahin Y.,(2000). Kompozit Malzemelere Giriş, GAZİ Kitabevi, ANKARA

Vasiliev V., E. V. Morozov,(2001). Mechanics and Analysis of CompositeMaterials, 1. Basım, Elsevier Science Ltd.

Walsh P.J.,(2001). CarbonFibers, ASM Handbook, 21, 35-40

Zhu K.,Wu D., Wang B., Zhao J., Jin, Z., Zhao, K., (2017). Reinforcing high-density polyethylene bypolyacrylonitrile fibers. ResearchPaper, Pigment &ResinTechnology,

# Functionalization of carbon nanotubes for the drug delivery in cancer treatment

Ö. Zeynep Güner[1], Elif Baysak[2], Sardar Bozoğlu[2], Nilgün Karatepe[2], Gürkan Hızal[2], F. Seniha Güner*[2], Hale Saybaşılı[1]

*[1]Boğaziçi University, Biomedical Engineering Institute, Istanbul, Turkey.
[2]Istanbul Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Department of Chemical Engineering, Istanbul, Turkey.

*Corresponding author e-mail: guners@itu.edu.tr

**Abstract**
Cancer is a significant health problem and the main cause of death worldwide. Targeted drug delivery is a possible replacement for classical cancer treatment, which includes chemotherapy, surgery, and radiation therapy. With this treatment, single-walled carbon nanotubes (SWNTs) are widely exploited. They have the advantage over other materials with their conductivity, large specific surface area, and chemical stability. However, the cytotoxicity of SWNTs is still a challenge in this field. The goal of the study is to obtain biocompatible SWNTs to use in targeted drug delivery. To reduce the toxicity of SWNTs and get an excellent drug carrier, we were modified SWNTs with a novel noncovalent functionalization method: adsorption of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-terminated aromatic amino acid-functionalized with poly(ethylene) glycol (PEG) chains onto pristine SWNTs. For that purpose, among biocompatible agents, we used a Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-terminated aromatic amino acid, due to operational simplicity, and PEG, an FDA-approved safe polymer, with two different molecular weights (PEG5000 and PEG12000). With this work, we can say that we successfully obtained functionalized SWNTs (f-SWNTs). In addition, we determined the most competent coating among synthesized f-SWNTs in terms the stability, binding efficiency, and suspending properties. Our results show that f-SWNTs has a big potential for cancer drug delivery.
**Keywords:** Cancer treatment, Carbon nanotubes, Fmoc-amino acids, Poly(ethylene) glycol

## INTRODUCTION

Cancer is a disease described by uncontrolled cell growth and the spread of these cells leads to mutations in a tissue, organ, or cell DNA. If the spread is not controlled, it may result in death. Today, health problems are rapidly increasing due to industrial development and environmental problems on the one hand and rapid population growth on the other (Siegel et al, 2018).

The classical cancer treatment includes chemotherapy, surgery, and radiation therapy. The main disadvantage of conventional therapies is the destruction of healthy cells as well as harmful cells during treatment (Siegel et al., 2018). Targeted drug delivery is a possible replacement for accepted methods. Therefore, efforts towards the development of targeted drug delivery systems capable of controlled drug release are continuing rapidly. There are many advantages of controlled drug delivery systems over conventional methods: site-specific drug delivery is possible, fewer side effects are observed, and lower drug concentration is needed (Alley et al., 2010; Bertrand et al., 2014; Brigger et al., 2002; Mura et al., 2013; Wang et al., 2012). Up until now, many nanocarriers were offered to use as drug delivery agents. Some of the widely used nanocarriers for chemotherapeutics delivery are liposomes, polymeric nanoparticles (Calzoni et al., 2019), dendrimers (Chauhan, 2018), carbon nanotubes (Jogi et al., 2018), mesoporous silica nanoparticles (Manzano and Vallet-Regí, 2020), micelles (Zhou et al., 2018), quantum dots (Zayed et al., 2019), gold (Farooq et al., 2018) and magnetic nanoparticles (Price et al, 2018).

In order to use purified CNT as a drug carrier, we must solve a significant problem: the biodegradability. To do that and obtain a perfected drug carrier, SWNTs are functionalized with various biocompatible molecules by chemical methods which improve the water solubility, decrease cytotoxicity, and advance drug targeting features of CNTs. For biomedical applications, surface chemistry or functionalization ensures the dissolution of CNTs, resulting in biocompatibility and low toxicity (Jogi et al., 2018).

Non-covalent binding of molecules to CNTs is the most commonly utilized drug delivery technique in literature. Regarding limitations, a non-covalently functionalized ideal CNT needs to have specific properties. This can be accomplished via forming micelle-type structures in which the amphiphilic molecules are coated to the CNT. Despite limitations, the non-covalent method has many advantages. Compared to chemical

modifications, the non-covalent method has two main advantages: (i) being able to operate under relatively mild reaction conditions, and (ii) maintaining the excellent graphitic structure of CNTs (Ravelli et al., 2013). In general, non-covalent functionalization can yield nanomaterials with enhanced reactivity, dispersibility, binding capacity, biocompatibility, catalytic activity, and sensing behavior (Bhattacharya et al., 2018; Ray, 2018). The above-mentioned modifications allow the CNT to cross the plasma membrane and encourage cellular uptake of tiny molecules and macromolecules such as nucleic acid (Umemura, 2014), peptide (Hu et al., 2015).

PEG is an FDA approved polymer, and it is the most preferred material for functionalizing CNTs, enhancing dispersion in aqueous solution and biocompatibility of CNTs (Cordeiro et al., 2018). The challenge in using PEG is that the difference in hydrophilicity of the CNT surface and PEG. PEG is a highly hydrophilic polymer. In contrary, the CNT surface is hydrophobic. An intermediary agent to functionalize the CNT surface is needed.

In this study, non-covalent functionalization was performed to improve the biocompatibility and water solubility of CNTs. For this purpose, 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc)-PEG complex was attached to the CNT surface. By connecting the PEG chains to the CNT wall, the strengths of the PEG chain and CNTs are combined; A blood-compatible, stable structure and excellent optical properties of nanomaterials can be obtained through the cell wall. The nanomaterials obtained in this way are promising great future as pharmaceutical vehicles with their superior properties.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Properties

PEG monomethyl ether with a molecular weight of 5000 and 12000 g/mol, Fmoc-Cysteine (Fmoc-Cys(Trt)-OH), were obtained from Sigma Aldrich. Fmoc refers to the 9-fluorenylmethyl carbonyl. Dichloromethane (DCM) was obtained from Aldrich and distilled on $P_2O_5$ before use. Tetrahydrofuran (THF; 99.8%, J.T. Baker), diethyl ether, dimethylaminopyridine (DMAP) and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) were purchased from Sigma Aldrich.

### Preparation of SWNTs

SWNT synthesis was carried out according to the fluidized bed chemical vapor deposition method connected with the gas flow to the reactor at 800°C (Dündar-Tekkaya and Karatepe, 2015; Karatepe and Yuca, 2011). During the production, $Fe_2O_3$ and MgO are used as catalysts. Afterward, the nanotubes were filtered, carefully washed using distilled water just before the pH arrive ~7, and dehydrated in air.

### Preparation of Fmoc-Cys(Trt)-OH Bearing Polymers (Cys-PEG)

A total of two Fmoc-PEG complexes were synthesized in the study. From the reaction of Fmoc-Cys(Trt)-OH with PEG5000 and PEG12000, Fmoc-PEG complexes were synthesized mainly by following the method specified in the literature (Meran et al., 2018; J. Zhang et al., 2016). First, monomethoxy PEG5000 (2.0 g) was dissolved in $CH_2Cl_2$ (30 ml) and mixed with Fmoc- Cys(Trt)-OH (0.45 g). DCC (0.37 g) and DMAP (0.122 g) dissolved in 10 ml of THF were added to the mixture, and the reaction was stirred at room temperature for 48 hours. At the end of the reaction time, the reaction solution was precipitated in diethyl ether. The solid white precipitate was filtered, washed with ether, and dried under vacuum overnight. This procedure was repeated for PEG12000. Sample codes are given in Table 1.

**Table 1.** Codes of the samples

| Code | Fmoc-Cys(Trt)-OH | PEG5000 | PEG12000 | SWNT |
|---|---|---|---|---|
| **Cys/PEG5000** | + | + | - | - |
| **Cys/PEG12000** | + | - | + | - |
| **Cys/PEG5000-SWNT** | + | - | - | + |
| **Cys/PEG12000-SWNT** | + | - | - | + |

## Functionalization of SWNTs with Cys-PEG

The procedure to functionalize SWNTs, attach the prepared Fmoc-PEG complexes to the SWNT wall, is described below for the Cys-PEG5000 complex. SWNT (50 mg) and Fmoc-PEG5000 (0.25 g) were added to a flask containing 50 mL of dry THF. The mixture was sonicated in an ultrasonic bath for 30 minutes and then stirred at room temperature for 72 hours. The resulting mixture was filtered using a filter (Sartorius, PTFE; pore size, 0.2 µm) to remove unbound Fmoc-PEGs. The solid remaining on the filter was then washed using THF (500 ml) and acetone (500 ml) and filtered again. The resulting black powder was then dried under vacuum for 24 hours. A similar process was used to get SWNTs functionalized with Cys-PEG12000.

## Characterization of Materials

**Transmission electron microscope.** High-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) images were obtained using a JEOL 2100 device operating at 200 kV. HR-TEM samples were prepared by dropping a diluted solution (in THF) of the sample on a holey carbon-coated copper grid.

**Fourier transform infrared (**FT-IR**) spectroscopy.** FT-IR spectra were examined with an Agilent Technologies Cary 630 FT-IR device in the range of 4000-500 cm-1. FT- IR spectra play an essential role in determining the binding of Fmoc-Cys (Trt)-OH to PEG because it can directly reveal the formation of new bonds after binding.

**Nuclear magnetic resonance spectroscopy**. The $^{1}H$ (500 MHz) spectra were recorded in CDCI3 using an Agilent VNMRS 500 device, and the structural characterization of the Fmoc-PEG complexes was performed.

**Fluorescence spectroscopy.** Fluorescence spectra were obtained using an F-4500 spectrophotometer. This study was carried out to verify the functionalization of SWNTs with PEG.

**Thermal gravimetric analysis.** Thermal gravimetric analyses (TGA) were performed on Perkin-Elmer Diamond TA/TGA with a heating rate of 10 °C.min$^{-1}$ under an inert atmosphere in the temperature range of room temperature to 800 °C. The functionalization amount and thermal stability of SWNTs were determined.

## RESULTS AND DISCUSSION

## Preparation and Characterization of SWNTs

SWNTs were synthesized by chemical vapor deposition (CVD) method. In order to ensure the type of CNT and determine the characteristics; Raman Spectroscopy, FT-IR, XRD, and TEM analysis were completed. TEM is the highest resolution technique that allows capturing the fine details of carbon nanotube samples. Single-walled carbon nanotubes with a diameter of 4 nm are visible in TEM images of synthesized CNTs which is given in Figure 1.

## Preparation of Fmoc/PEG complexes

The molecule to be bound to PEG is 9-fluorenylmethyl carbonyl, which is also used as a protecting group in the organic synthesis of peptides (Turecek et al., 2016). Fmoc contains an aromatic fluorenyl group that can be easily attached to PEG. Structural characterization of Fmoc-Cys(Trt)-OH connected by different molecular weight PEGs was monitored by FT-IR spectrometry. The characteristic peaks observed in all spectra at approximately 2880 cm-1 originate from the -CH2CH2O- group contained by PEG (Zeng et al., 2014). Looking at the literature, around 1720 cm-1 bands seen in the Fmoc-PEG spectra correspond to the carbonyl carbamate of the Fmoc group (Singh et al., 2015). FTIR results support that we are successfully synthesized Cys/PEG structure.

In addition, to support the FT-IR data, the binding of Fmoc-Cys(Trt)-OH to PEG monomethyl ether is examined by $^{1}$H NMR spectra. Fmoc-Cys(trt)-PEG5000 spectrum gave signals representing the methylene protons of the PEG backbone at 3.6 ppm. (Dust et al., 1990; Samaritoni et al., 2018).

## Functionalization of SWNTs with Fmoc/PEG complexes

Fmoc-Cys(Trt)-OH was used for direct CNT immobilization. Also, it is known that Fmoc amino acids can interact via the π-π bond because such molecules can self-associate with nanostructures (Cousins et al., 2009). In this study, Fmoc-PEG complexes are physically mounted to SWNTs for noncovalent functionalization of CNTs. With the computational studies carried out in the project numbered MGA-2019-41823 carried out within the scope of the ITU BAP Unit, it was found that the Fmoc-Cys(Trt)-OH have stacked on the surface of the CNT thanks to the aromatic fluorenyl groups. The schematic representation of the functionalized SWNT preparation is given in Figure 2.

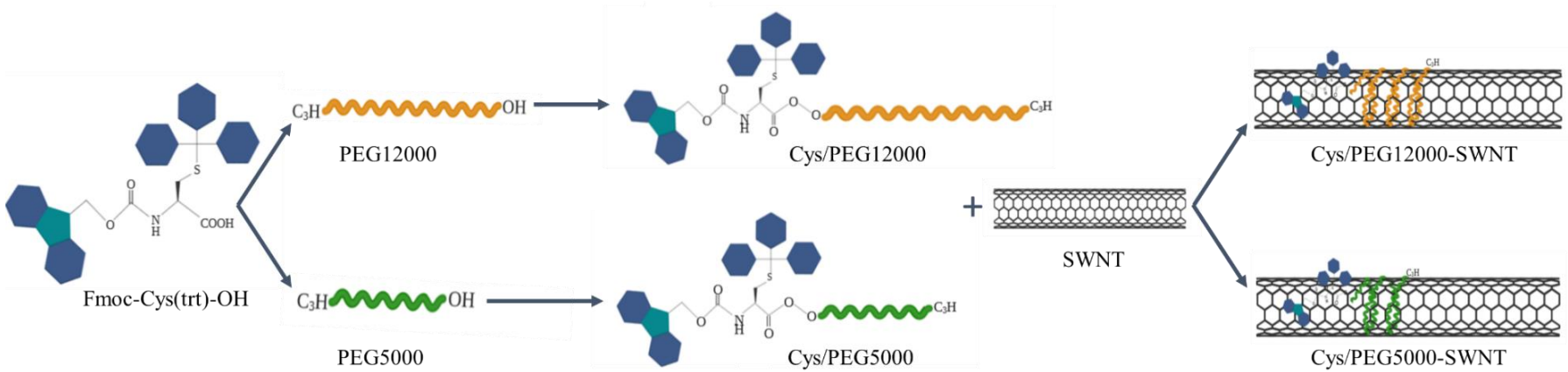



**Figure 2.** Schematic illustration of the functionalized SWNT preparation.

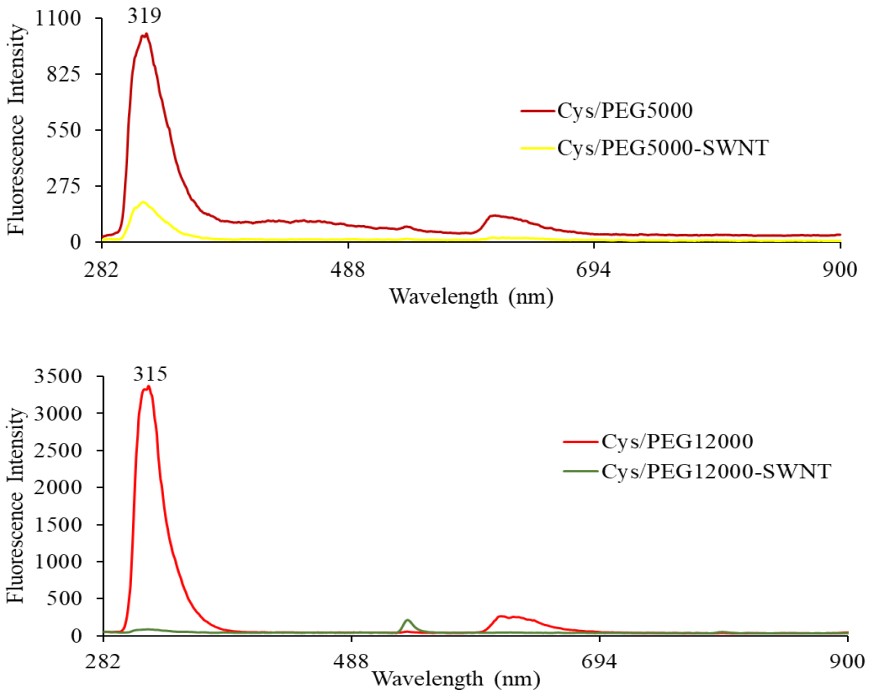



**Figure 3.** Fluorescence Spectra for Cys/PEG12000 and Cys/PEG12000-SWNT.

Figure 3 shows the fluorescence spectra of Fmoc-Cys(trt)-PEG5000 and Fmoc-Cys(trt)-PEG12000. These fluorescence spectra are specific for Fmoc. In the Fmoc-PEG-SWNT complexes, the Fmoc groups fluorescence is quenched and provides evidence that the hydrophobic ends of this group in the ring structure are adsorbed onto the SWNT surface. As seen in Figure 3, the peaks at 315 and 319 nm in the spectrum of the Fmoc-PEG complex are damped after the step of binding to SWNT. The hydrophilic PEG chain is expected to extend into the solution. The π- π bond between the aromatic rings has also been reported in the literature that may cause the fluorescence spectrum to dampen in energy transfer (P. Zhang et al., 2014).

The amount of Fmoc-Cys(Trt)-OH attached to the CNT surface was determined by TGA analysis (Figure 4). In order to confirm the attachment, and to eliminate the chain length effect of PEG, the amount of Cys/PEG related to SWNTs was determined and TGA analysis was performed as specified in the characterization of the materials section. Also, we need to prove that the Cys/PEG complex bound to the SWNT surface. As shown in Figure 4, that there is only a negligible difference in percent weight loss between Cys/PEG5000 and Cys/PEG12000, and it is clearly seen that weight loss is ~95%. On the other hand, for Cys/PEG5000-SWNT and Cys/PEG12000-SWNT, a significant decrease in weight loss indicates that the Cys/PEG complexes bind to the surface of SWNTs. Investigating the difference in PEG chain length, Cys/PEG5000-SWNT has more percent weight loss than Cys/PEG12000-SWNT. Since we put the equal amounts of Cys/PEG5000 and Cys/PEG12000 when coating the SWNTs, we can say that SWNTs are more effectively coated with Cys/PEG5000 complex.

## Dispersion in water

The dispersion of SWNT in water was examined in 0, 1, 3 and 5-hours. The results of the experiments performed to determine the dispersion behavior of SWNT modified with Cys/PEG complexes are shown in

Figure 5. CNT dispersions were obtained by non-covalent modifications using Cys/PEG complexes with aromatic functionality mounted on nanotube surfaces with π-π interactions. The CNT surface is hydrophobic, and when Fmoc amino acids are bound to the surface, polar groups of PEG (-OH and -COOH) lead to surfactant-like properties. As stated in the literature, supplementary interactions arise among the surface-bound and unbound Fmoc amino acids by π-π stacking and hydrogen bonding; this can support the complete development of a stable nanotube distribution in the aqueous medium (Cousins et al., 2009). As shown in Figure 5, it was determined that Cys/PEG5000-SWNT provides the best dispersing feature.

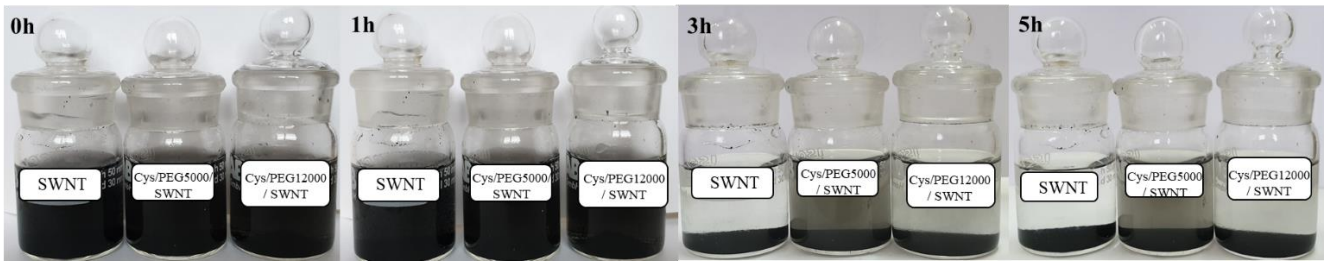



**Figure 5.** Dispersion of pristine CNT, Cys/PEG5000-SWNT, and Cys/PEG12000-SWNT

We can say that the synthesized and characterized f-SWNTs have been successfully prepared as a drug delivery agent based on all the features described above. In the literature, it is seen that loading and releasing studies of various cancer drugs are carried out for similar biocompatible drug delivery systems. Similarly, drug loading and release behaviors for this system can be examined using, for example, doxorubicin, mitoxantrone, and gemcitabine.(Beg et al., 2018)

## CONCLUSION

In this study, an integrative approach was used to develop a nanocarrier for use as a drug delivery system. In order to improve the biocompatibility of CNTs and increase water solubility, non-covalent functionalization was performed. For this purpose, PEG (PEG5000, and PEG12000) carrying a Fmoc-aminoacid were attached to the SWNT surface. Cysteine is selected as the amino acid to which the Fmoc groups used. This system was designed for drug transport and is completed in 3 steps. Primarily, to form the basis of the system, SWNT was synthesized using the CVD method. Thereafter, the Cys/PEG complexes were prepared. Lastly, prepared Cys/PEG complexes were mounted on the SWNT wall. Based on the literature, it is revealed that PEG-SWNTs carrying Fmoc-Cys molecules have the necessary structural strength. The stability, binding efficiency, and suspending properties of Cys/PEG-coated SWNTs were investigated with the characterization studies. In order to verify the synthesis of functionalized SWNTs, every step of the process is characterized.

To follow the synthesis of Fmoc/PEG complexes, FTIR and $^{1}$H NMR spectra were used. The attachment of Cys/PEG complexes on SWNTs was ensured with a fluorescence spectrophotometer, and the amount of this attachment was determined by thermogravimetric analysis. As a result, we can say that the Cys/PEG500 complex is more effectively attached to SWNTs. Moreover, results of dispersion in water can be used in further optimization of PEG chain length. It can be deduced from its dispersion that Cys/PEG5000-SWNT has improved blood stay. It is beneficial to investigate the blood stay of the materials.

After all, by connecting PEG chains containing Fmoc-Cys to the CNT wall, the strength of the PEG chain and CNTs were combined; a nano-carrier, which is biocompatible, has the potential to pass through the cell wall, has a stable structure, was synthesized. The synthesized product will be a nano-carrier, which can perform targeted drug transport and release, minimizing harm/side effects in line with the need for alternative methods in cancer treatment.

Conducting in-vivo experiments is a good starting point to further optimize f-SWNTs for commercial use. Also, after completely proving biocompatibility of the f-SWNTs, drug loading and release properties must be investigated. Furthermore, other molecules, proteins or biological particles can be used to functionalize SWNTs. Besides, molecular interactions of the system should be examined through computational methods. After some further study, this material has great potential for commercial use in cancer imaging and therapy.

## REFERENCES

Alley, S. C., Okeley, N. M., & Senter, P. D. (2010). Antibody-drug conjugates: Targeted drug delivery for cancer. *Current Opinion in Chemical Biology*, *14*(4), 529–537. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.170

Beg, S., Rahman, M., Jain, A., Saini, S., Hasnain, M. S., Swain, S., … Akhter, S. (2018). Emergence in the functionalized carbon nanotubes as smart nanocarriers for drug delivery applications. In *Fullerenes, Graphenes and Nanotubes: A Pharmaceutical Approach*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813691-1.00004-X

Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *66*, 2–25. https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009

Bhattacharya, K., Sacchetti, C., Costa, P. M., Sommertune, J., Brandner, B. D., Magrini, A., … Fadeel, B. (2018). Nitric Oxide Dependent Degradation of Polyethylene Glycol-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes: Implications for Intra-Articular Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(6), 1–11. https://doi.org/10.1002/adhm.201700916

Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*(5), 631–651. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00044-3

Calzoni, E., Cesaretti, A., Polchi, A., Di Michele, A., Tancini, B., & Emiliani, C. (2019). Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies. *Journal of Functional Biomaterials*, *10*(1), 1–15. https://doi.org/10.3390/jfb10010004

Chauhan, A. S. (2018). Dendrimers for Drug Delivery. *Molecules*, *23*(4). https://doi.org/10.3390/molecules23040938

Cordeiro, M. F., Girardi, F. A., Gonçalves, C. O. F., Peixoto, C. S., Dal Bosco, L., Sahoo, S. K., … Barros, D. M. (2018). Toxicological assessment of PEGylated single-walled carbon nanotubes in early developing zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *347*, 54–59. https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.031

Cousins, B. G., Das, A. K., Sharma, R., Li, Y., McNamara, J. P., Hillier, I. H., … Ulijn, R. V. (2009). Enzyme-activated surfactants for dispersion of carbon nanotubes. *Small*, *5*(5), 587–590. https://doi.org/10.1002/smll.200801184

Dündar-Tekkaya, E., & Karatepe, N. (2015). Effect of reaction time, weight ratio, and type of catalyst on the yield of single-wall carbon nanotubes synthesized by chemical vapor deposition of acetylene. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*, *23*(6), 535–541. https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.873030

Dust, J. M., Fang, Z. H., & Harris, J. M. (1990). Proton NMR Characterization of Poly(ethylene Glycols) and Derivatives. *Macromolecules*, *23*(16), 3742–3746. https://doi.org/10.1021/ma00218a005

Farooq, M. U., Novosad, V., Rozhkova, E. A., Wali, H., Ali, A., Fateh, A. A., … Wang, Z. (2018). Gold Nanoparticles-enabled Efficient Dual Delivery of Anticancer Therapeutics to HeLa Cells. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21331-y

Hu, Z., Zhao, J., Song, Z., & Yang, C. (2015). Filled and peptide-modified single-walled carbon nanotubes: Synthesis, characterization, and in vitro test for cancer cell targeting. *RSC Advances*, *5*(22), 16792–16800. https://doi.org/10.1039/c4ra17047d

Jogi, H., Maheshwari, R., Raval, N., Kuche, K., Tambe, V., Mak, K. K., … Tekade, R. K. (2018). Carbon nanotubes in the delivery of anticancer herbal drugs. *Nanomedicine*, *13*(10), 1187–1220. https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0397

Karatepe, N., & Yuca, N. (2011). Hydrogen adsorption on carbon nanotubes purified by different methods.

*International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(17), 11467–11473. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.128

Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2020). Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*, *30*(2), 3–5. https://doi.org/10.1002/adfm.201902634

Meran, M., Akkus, P. D., Kurkcuoglu, O., Baysak, E., Hizal, G., Haciosmanoglu, E., … Güner, F. S. (2018). Noncovalent Pyrene-Polyethylene Glycol Coatings of Carbon Nanotubes Achieve in Vitro Biocompatibility. *Langmuir*, *34*(40), 12071–12082. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00971

Mura, S., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*, *12*(11), 991–1003. https://doi.org/10.1038/nmat3776

Price, P. M., Mahmoud, W. E., Al-Ghamdi, A. A., & Bronstein, L. M. (2018). Magnetic drug delivery: Where the field is going. *Frontiers in Chemistry*, *6*(DEC), 1–7. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00619

Ravelli, D., Merli, D., Quartarone, E., Profumo, A., Mustarelli, P., & Fagnoni, M. (2013). PEGylated carbon nanotubes: Preparation, properties and applications. *RSC Advances*, *3*(33), 13569–13582. https://doi.org/10.1039/c3ra40852c

Ray, S. S. (2018). *Springer Series in Materials Science volume 278, Processing of Nanocomposites*.

Samaritoni, J. G., Martynow, J. G., O'Donnell, M. J., & Scott, W. L. (2018). Preparation and Use of a General Solid-Phase Intermediate to Biomimetic Scaffolds and Peptide Condensations. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *23*(7). https://doi.org/10.3390/molecules23071762

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(1), 7–30. https://doi.org/10.3322/caac.21442

Singh, V., Snigdha, K., Singh, C., Sinha, N., & Thakur, A. K. (2015). Understanding the self-assembly of Fmoc-phenylalanine to hydrogel formation. *Soft Matter*, *11*(26), 5353–5364. https://doi.org/10.1039/c5sm00843c

Turecek, P. L., Bossard, M. J., Schoetens, F., & Ivens, I. A. (2016). PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *105*(2), 460–475. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.015

Umemura, K. (2014). Hybrids of nucleic acids and carbon nanotubes for nanobiotechnology. *Nanomaterials*, *5*(1), 321–350. https://doi.org/10.3390/nano5010321

Wang, A. Z., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annual Review of Medicine*, *63*(1), 185–198. https://doi.org/10.1146/annurev-med-040210-162544

Zayed, D. G., Abdelhamid, A. S., Freag, M. S., & Elzoghby, A. O. (2019). Hybrid quantum dot-based theranostic nanomedicines for tumor-Targeted drug delivery and cancer imaging. *Nanomedicine*, *14*(3), 225–228. https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0414

Zeng, S., Wu, F., Li, B., Song, X., Zheng, Y., He, G., … Huang, W. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of a novel amphiphilic polymer RGD-PEG-chol for target drug delivery system. *The Scientific World Journal*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/546176

Zhang, J., Landry, M. P., Barone, P. W., Kim, J., Ulissi, Z. W., Lin, D., … Li, D. (2016). *Phases : Nanotube Antibodies*. *8*(12), 959–968. https://doi.org/10.1038/nnano.2013.236.Molecular

Zhang, P., Lu, J., Huang, Y., Zhao, W., Zhang, Y., Zhang, X., … Li, S. (2014). Design and evaluation of a pegylated lipopeptide equipped with drug-interactive motifs as an improved drug carrier. *AAPS Journal*, *16*(1), 114–124. https://doi.org/10.1208/s12248-013-9536-9

Zhou, Q., Zhang, L., Yang, T. H., & Wu, H. (2018). Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 2921–2942. https://doi.org/10.2147/IJN.S158696

# Cultivation, isolation and identification of *Acidithiobacillus ferooxidans* from Artvin mine drainage and evaluation of its biodegradation on polycyclic aromatic hydrocarbons

İlkgül Akmayan, Kübra Trabzonlu, Fatma Pınar Çağlar Eyol, Tülin Arasoğlu*

Yıldız Technical University, Molecular Biology and GeneticsDepartment, ISTANBUL, Turkey.

*ozbektulin@gmail.com

## ABSTRACT

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is an acidophilic microorganism used in desulphurization, biodegradation and bioleaching research of fossil fuels. In the presented study, primarily, *Acidithiobacillus ferrooxidans* were obtained from the Artvin (Turkey) mine drainage. Secondly a modified 9K medium (solid / liquid) was prepared for culture of this microorganism and the organism growth was observed both microscopically and spectroscopically. Then *A. ferrooxidans was* identified molecularly with the 16s rRNA gene and was also morphologically characterized by SEM. Finally the effect of *A. ferrooxidans* on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which cause great concerns in environmental and health related issues in crude oil, was evaluated. For this purpose, crude oil taken from İzmir Aliağa Refinery was added to *A.ferrooxidans* cultures at the rates of 0.5% - 1% - 2% and 4%.The degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the existing oil in cultures was analyzed by 1H-NMR spectroscopy method in different days of incubation 1,7,14,21,28 days. The ratio between the integration of proton peaks of aromatic structures and PAH fragmentation was determined by three replicate experiments in order to determine the use of organism as PAHs energy source. These results show that the *A.ferrooxidans* bacteria which obtained from the mine drainage of Artvin province of our country can be used for PAH remediation.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, biodegradation, NMR, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).

## 1. INTRODUCTION

Whereas acidophilic bacteria can live in environments pH less than 7, extrem acidophilic bacteria lives in an extremely acidic environment pH of less than 3 (Johnson and Hallberg 2008; Quatrini and Johnson 2018). Although our knowledge about the microbial components of acidic microbiomes increases day by day, how affects organism on changes of living conditions is limited. Therefore, in order to better define the biogeography of acidophilic organisms, the iron / sulfur concentration, associated redox potentials and growth graphs obtained from different geographies are very important (Quatrini and Johnson 2018). Acidophilic bacteria contribute to a large number of biogeochemical cycles, including the iron and sulfur cycles (Austin and Dopson 2007).

*Acidithiobacillus ferrooxidans*, known as *Thiobacillus ferrooxidans*, is an important microorganism that provides a positive effect to the nature.This microorganism is highly related to heavy metals. It is an important bacterial variety that contributes to the country's economy, which is involved in bioleaching and desulphurization of metal sulphides and biodegradation of petroleum and petroleum-derived materials. (Sand et al., 2001, Alvarez and Jerez, 2004, Oliveira et al., 2008, Zhao et al., 2012, Liu et al., 2020). *Acidithiobacillus ferrooxidans* is chemolithoautrophic bacteria, which is one of the acidophilic bacteria that contribute to the environmental cycle, belongs to γ-proteobacterium (Valdes et al., 2008) group and its genome size is 2.89–4.18 Mb (Zhang et al., 2018). Besides, the bacteria have important characteristic features like oxidation of reduced sulfur compounds, reduced iron oxidation, carbon dioxide fixation (Barron and Lueking 1990). Due to using of metal sulphides, reduced inorganic sulfur or iron components as energy sources in its metabolic activity (Chengying et al 2009),it is used in many processes of industrial and biotechnological importance such as removal of hydrogen sulfide from wastewater, sulfur removal from coal (desulphurization of coal), recovery / extraction and extraction of metals from sulfuric ores, and hydrocarbon degredation (Xıong and Guo 2011; Quatrini et al., 2009).

Petroleum has high economic value, but it also damages the environment significantly. In particular, natural crude oil spills are also among the main sources of water and soil pollution, along with pollution that occurs during oil exploration and subsequent extraction, processing, transportation and storage (Das and Chandran 2010). Hydrocarbons in oil cover the surface of the soil and close the pores in the soil. It negatively affects the population of animals, plants and microorganisms living on the soil whose pores are closed (Das and Chandran 2010). Petroleum can contain hydrocarbons in different proportions and types depending on the geographical location (saturated hydrocarbons, aromatics, asphaltenes (phenols, fatty acids, ketones, esters and porphyrins)

and resins (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxides and amides)) (Das and Chandran 2010). It is also included in the literature that various bacteria, yeasts and fungi can be used in the breakdown of these hydrocarbons with the bioremediation period of oil (Wentzel et al., 2007, Martin et al., 2010, Das and Chandran 2011, Kumari 2018). However, microbial degradation has been reported to vary both by species and depending on factors such as oil quantity, quality and exposure time (Wentzel et al., 2007, Martin et al., 2010).
In this presented study; Turkey's derived from a bacterium acidophilic *A.ferrooxidans* Artvin district was identified by 16S rDNA sequencing analysis using molecularly. Then, the growth curve of the organism using different media to ensure standardization of the culture conditions of the organism; morphological, microscopic and chemically evaluated. At the last stage, the effect of the relevant organism on crude oil biodegradation will be evaluated by NMR method in terms of oil concentration and exposure time.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Optimization of Different Agar Mediums

Firstly, 3 different solutions were used for the preparation of heterotrophic solid media. The first of these solutions, solution A, is heterotrophic basal salt solution ($Na_2SO_4.10H_2O$ 7.5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 22.5 g/L, KCl 2.5 g/L, $MgSO_4.7H_20$ 25 g/L, $KH_2PO_4$ 2.5 g/L, Ca $(NO_3)_2.4H_2O$ 0.7g/L) containing 0.2 g / lt yeast extract. After preparation, its pH adjusted to pH 3 and sterilized. Solution B containing 2 g /L agarose (Type I) was perpared and sterilized. The iron sulfate solution (1M- solution C) was prepared and adjusted to pH 2 and then sterilized with 0.22 filter. After that, solutions A and C were combined and poured into Petri dishes (Solution A + C, 8 ml; Solution B, agar 2 ml). After the medium has solidified, spread cultivation with 1 ml of bacterial culture was carried out on petri plates, and the petri dishes incubated 28 $^oC$ in 15 days. (Tena et al., 2017). Secondly, 3 different solutions were used for preparation of iron-tripton solid media. The first of these solutions, solution A, is basal salt solution $(NH_4)_2SO_4$ 12.5 gL, $MgSO_4.7H_2O$ 5 g/L) containing tripton soy broth 2,5 g / L. After preparation, its pH adjusted to 3 and sterilized. Solution B containing 3,84 g / L agarose was perpared and sterilized. Preparation of the third solution, 1M ferrous sulfate solution, and subsequent processes of combining solutions, adding bacteria and cultivation were carried out as in the previous heterotrophic solid media. (Tena et al., 2017). Inorganic iron solid medium was used as the third different medium. While preparing this, heterotrophic basal salt solution was used as solution A and medium containing 19.2 g / L agarose was used as solution B. Iron sulfate solution defined as Solution C is the same as those added to previous media (Tena et al., 2017). The next steps were carried out similar to the previous steps. The medium prepared as the fourth was designed differently than the first three. The solution A containing 1.8 g / L of $(NH_2)SO_4$, 0.7 g / L of $MgS0_4.7H_20$, 0.35 g / L triptic soy broth; solution B containing 20% (w / v) $FeS0_4.7H_20$; solution C containing 2.8% agarose were combined in a 1: 14: 5 ratio and poured into Petri dishes. After that, 1 ml of bacterial culture was spread out on petri plates, and the plates incubated 28 $^oC$ in 15 days. Finally; $(NH_4)_2S0_4$ (3 g/L), KCl (0.1 g/L), Ca $(NO_3)_2$ 0.01 g, $K_2HP0_4$ (0.5 g/L), $FeS0_4.7H_20$ (16.5 g/L) were weighed and dissolved in distilled water. The medium was then autoclaved by adding 0.7% agarose to this solution (w / v). After that, again 1 ml of bacterial culture was spread on petri plates and incubated at 28 ° C within 15 days (Tena et al., 2017).

### 2.2 Preparing of Liquid Medium

A modified 9K broth was used for the development of *A.ferrooxidans.* Firstly, 2 solutions were prepared for this medium. The amounts of Solution I content determined as follows; 3 g/L of ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$), 0.1 g/L of potassium chloride (KCl), dipotassium phosphate ($K_2HPO_4$), 0.5 g/L of magnesium sulfate ($MgS0_4.7H_20$) and 0.01 g/L of calcium nitrate ($Ca(NO_3)_2$). Then, the pH of solution was adjusted to 5.5 with 6N $H_2SO_4$ and sterilized (Silverman and Lundgren, 1959). Solution II containing iron sulfate ($FeSO_4.7H_2O$) was mixed in a magnetic stirrer to dissolve in distilled water and adjusted to pH 1.4 with 6N $H_2SO_4$ (Jensen and Webb, 1995) and sterilized by 0.22 µm (Silverman and Lundgren, 1959). The solutions were mixed according to the ratio of 7 to 3. The addition of bacteria was inoculated into the freshly prepared medium with a final concentration of 10% (Xiao et al., 2013)

### 2.3 Genomic DNA Isolation and 16s rDNA PCR

The bacterial culture that completed its development in seven days was taken 50-100 ml and centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes. The inorganic pellet portion was discarded. Afterwards, a second centrifuge was made for about 60 minutes at 10000 rpm, allowing the bacteria to settle. To remove ferrous compounds from *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells growing in the ferrous medium, it was first washed twice with $H_2SO_4$, 10

mM pH 2.2. Afterwards, washing was made twice with PBS. Genomic DNA was isolated using the HiPurATMBacterial Genomic DNA Purification Kit (Ilieva et al., 2011; Peng et al., 2006).

The 16S rRNA gene of the isolated total genome was amplified by PCR using universal primers 16sF (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) and 800 R (5′-TACCAGGGTATCTAATCC-3 ‘). (Duga et al., 1998, Sajjad et al., 2016). PCR reaction conditions; 25 µl of dream Taq Green PCR Master Mix, 1 µM forward primer, 1 µM reverse primer, 10 pg-1 µg DNA and 50 µl of final volume with deionized water. The PCR reaction is as follows; First denaturation at 95 ° C 1 min, then 95 ° C denaturation for 30 seconds, annealing at 50 ° C for 1 minute, extension at 72 ° C for 1 minute 35 cycles, and 72 ° C for 10 minutes extension

## 2.4. Analysis of SEM

In characterization with SEM, the bacterial culture was first centrifuged at 9000 rpm for one hour. The pellet was then washed twice with $H_2SO_4$ and PBS. The washed pellet was dried at room temperature. *Acidithiobacillus ferrooxidans* was coated with gold which is conductive material for visualising surface morphology in SEM (Zeiss EVO LS 10). SEM images were taken with an acceleration voltage of 10 kV and magnification of 30.000x.

### 2.5 Physiological Characterization

#### 2.5.1. Determination of Ferrous Iron ($Fe^{+2}$) Amount with Perganometric Method

Potassium permanganate is oxidizing and this effect varies depending on whether the medium is acidic or basic. Titrations with $KMnO_4$ are usually made in an acidic environment. First, 3.16 g of KMnO4 was dissolved in 1 liter of boiling water to prepare the 0.1 N KMnO4 solution. It was boiled for 5 minutes and left overnight in a sealed bottle. It was taken into a bottle by filtering through glass cotton. It was taken from freshly prepared $Fe_2SO_4$ solution in a certain volume and was diluted with distilled water (final volume 30 mL). After that, 10 ml of 6N $H_2SO_4$ solution was added to this solution. It was titrated with 0.1 N KMnO4 solution until pink color was observed and the result was was recorded (Rosenfeld 1999).

#### 2.5.2. Hydrocarbon Degradation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in Liquid Medium

After the optimization studies on the growth and development of *A. ferrooxidans* were completed, the effect of this bacterium on the degradation of hydrocarbons in crude oil was analyzed by NMR. For this purpose, 100 ml of bacterial culture ($OD_{600=}$ 0,085±0,02; 1.0 x$10^7$CFU/$ml^{-1}$ by thoma counter) was added to the tubes containing 0.5% - 1% - 2% and 4% crude oil, respectively. Since it was observed that *A. ferrooxidans* reached the desired growth curve in 7 days by subculturing, NMR analysis was performed in triplicate on the 1st, 7th, 14th, 21st and 28th days for hydrocarbon degradation in crude oil. Three different control groups were perpared; bacteria-free, containing only bacteria, containing 0.5% - 1% - 2% and 4% crude oil without bacteria, respectively. All tupes were incubated at 200 rpm in a shaker at 28°C for 28 day. At the specified time intervals, the contents were extracted using organic solvent mixture to analyse the residual hydrocarbons. Briefly, 10 ml of test sample was transferred to a 50 ml clean conical centrifuge tube. The tube was centrifuged for 5 minutes at 5000 rpm. The supernatant was collected and n-Hexane and $CH_2Cl_2$ were added to it in 1 to 1 ratio as solvent. After vortexing thoroughly, the phase containing the organic solvent and residue was transferred to a new tube. These procedures were repeated three times in total (Kumari et al 2018).

#### 2.5.3. NMR Analysis

In order to obtain the PAH values, the dried samples which contains organic residues were undergone 1H-NMR analysis. For the analysis each sample was dissolved in 1 ml of CDCl3. 1H-NMR analysis run with Bruker Avance III 500MHz NMR spectrameter. Each analysis done with 512 scans TD: 65536. The spectrum sweep width was 20.66 ppm. In the spectrums, proton peaks which belong to the aromatic structures were observed between 7.60 – 6.85 ppm (A). And peaks which belong to the aliphatic structures were observed between 1.85 – 0.55 ppm (B) . The ratio (X) of the integrals of these two groups were calculated as :X=B/A

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The development of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on five different medium was observed 28 ºC for 15 days. The best result was detected in the fifth solid medium as shown in Figure 1A. After that, we worked to optimize the development conditions in the liquid medium. In the cultivation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, both the medium and the amount of liquid culture transferred are important. In our study, when we added 10 mL of bacterial culture to 100 ml of freshly prepared medium, we observed that the bacteria developed better as in Figure 1B. In addition, the counting bacteria with Thoma slide, examining the bacteria with Gram staining under light microscopy and absorbance measurements with UV-VIS spectroscopy have confirmed the development of the microorganism (Bhaskara et al 2019). In our study, in the experiments in which subculture time is desired to be optimized, there was not enough development in the subculture done every 4 days. However, Xie *et al.* stated that their desired growth rate was achieved in their subculture in 4-6 days. However, in our study, the desired results were achieved in subcultures performed every 6 days. It was confirmed by the permanganometric method that A. ferrooxidans, which developed at a concentration of 10%, continued the iron reduction reaction effectively until the 14th day when the subculture was performed (Rosenfeld 1999).

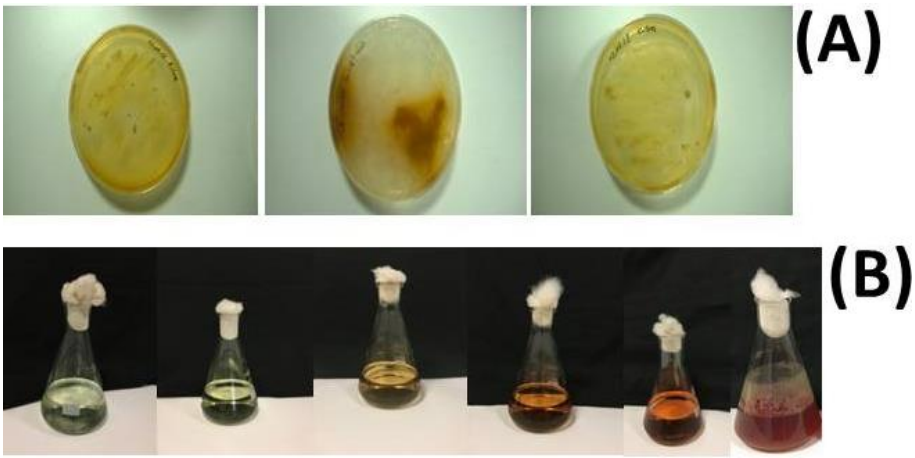



**Figure 1.** *A. ferrooxidans* in solid culture (A), Growth images achieved by subculturing every 7 days of *A ferrooxidans*, which has completed its development for 15 days (B).

In Figure 2A, the effect of bacterial culture added in different amounts on pH was evaluated for two weeks (4 mL, 7 mL, 10 mL). As expected, cultures containing 7 and 10 ml of bacterial cultures have a higher pH than culture containing 4 ml of bacterial cultures. pH values for all three cultures increased gradually until the 14th day. After this time, pH values declined. In Figure 2B, the growth and development of the bacterial culture, which was added in different amounts at the beginning (4 mL, 7 mL, 10 mL), for 15 days was evaluated by measuring the absorbance values with a UV spectrofometer (Figure 5). As expected, on day 14, the medium containing 7 mL of bacterial medium had the highest absorbance rate, while the medium containing 4 ml of bacterial medium had the minimum absorbance rate. The best bacterial growth was also observed in subculturing by adding 10 ml of bacterial culture to 100 ml of newly prepared medium using spectrophotometric measurements and thoma count method for 15 days. (Figure 2C). The effect of *A. ferroxidans* on iron reduction in the medium was permanganometric method for 7 days (Figure 2D). As seen in the figure, bacterial growth day by day accelerated the iron reduction reaction and oxidized the ferrous iron ($Fe^{+2}$) after one week.

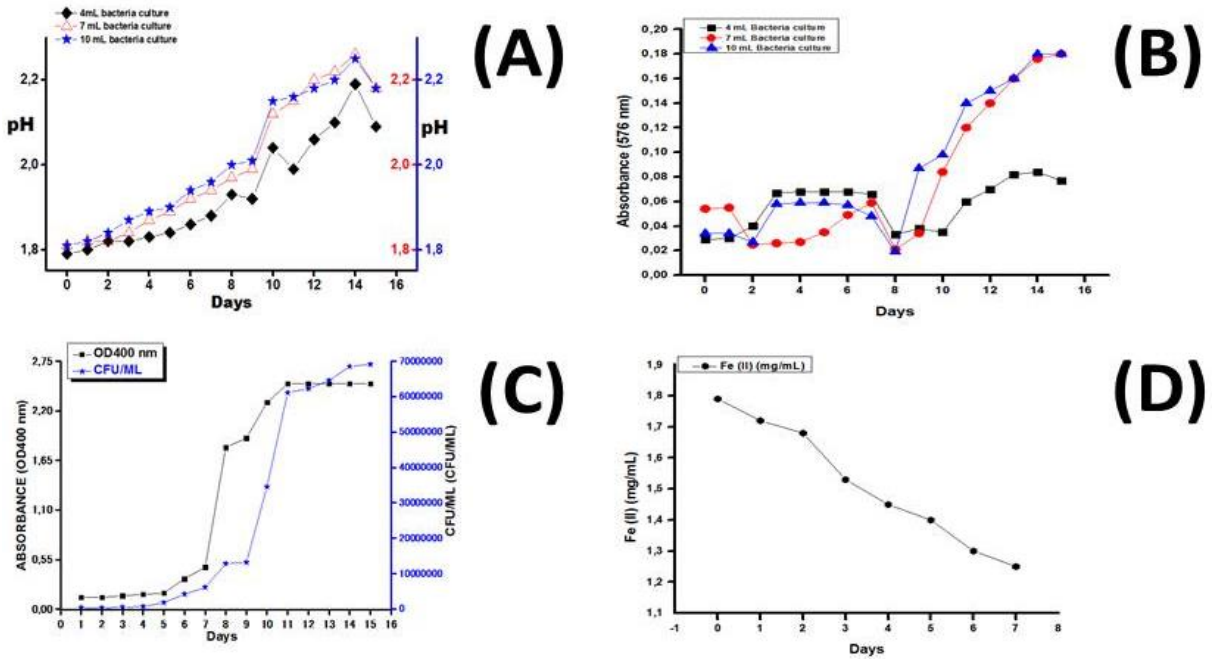
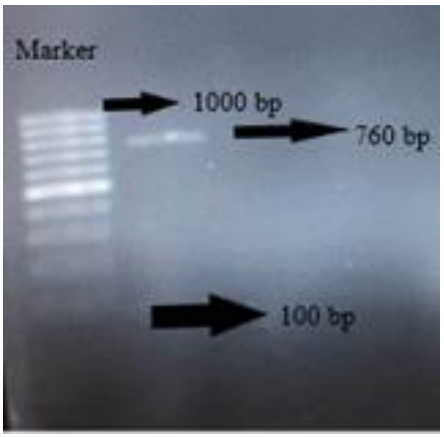



**Figure 2.** pH change (A), absorbance values (B) of 4, 7 and 10 mL bacterial culture; absorbance values and thoma counter cell (C) and $Fe^{+2}$ change of only 10 mL bacterial subculture,

Genomic DNA isolation and 16s rDNA PCR were performed after observing the good growth of the microorganism. In the PCR, which was used 16s F and 800 R universal primers, the amplification product was 760 bp in size. (Figure 3). The blast results obtained after sequencing showed 99% similarity to *A. ferrooxidans*. In the SEM analysis for bacterial morphology, it was observed that *A. ferroxidans* had a width of 0.5–0.6 micrometers and a length of 1.0-2.0 mm. Sometimes it can look like a coccus, as it curls up in itself. (Daoud and Karamanev 2006) (Figure 4)



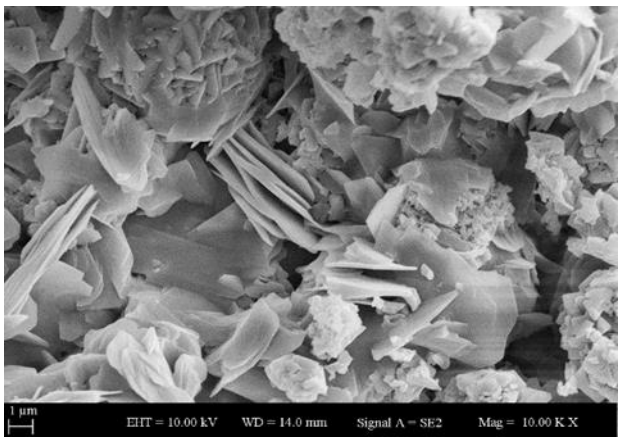




**Figure 3.** *Acidithiobacillus ferrooxidans* gel image. **Figure 4.** SEM image of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

After obtaining a rapidly growing *A. ferroxidans culture* by subculturing, NMR analysis was performed for the effect of this culture on the degradation of PAHs in crude oil. Hydrocarbons in crude oil are generally classified into 2 types: aliphatic and aromatic hydrocarbons. In hydrocarbons, the $^{13}$C-NMR and $^{1}$H-NMR spectroscopy method are being used to determine the double bound compounds or to determine the number of aromatic carbon atoms. It is known that *A. ferrooxidans* are used in crude oil studies. In our study, we analyzed the effect of this bacterium isolated from the city of ARTVİN on the polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil from İzmir / Aliağa Refinery by 1H-NMR. All the experiments were incubated for 28 days and the samples for the NMR analysis were collected every 7 days. This helped us to observe the changes in PAH concentrations throughout the different growing phases of the *A. ferrooxidans*. Water-based liquid samples were extracted with organic solvents in order to obtain all the organic residues. Therefore the investigation in

which we aimed to examine the PAH degradation capacity of *A. ferrooxidans* in the liquid broth that includes different crude oil concentrations in the course of 28 days. The bacteria concentrations were 10% (v/v) for all the trials. In this analysis, it was extracted with n-hexane: $CH_2Cl_2$ (1:1) the residual hydrocarbons by taking samples at different intervals (1st, 7th, 14th, 21st and 28th) determined from bacterial cultures containing different amounts of crude oil (0.5% - 1% - 2% and 4%). The analysis of the peak integrations was not successful due to the low peak integrals belong to the aromatic structures. The NMR spectrums obtained are as follows. The calculation of the integrals was made to compare aromatic and aliphatic peaks in the NMR analyses (Sugıura et al., 1997) (Figure 5). According to the data from the spectra, it has been determined that the aromatic carbon derivatives in our crude oil samples are not sufficient to monitor the decomposition from aromatic structures to aliphatic structures.

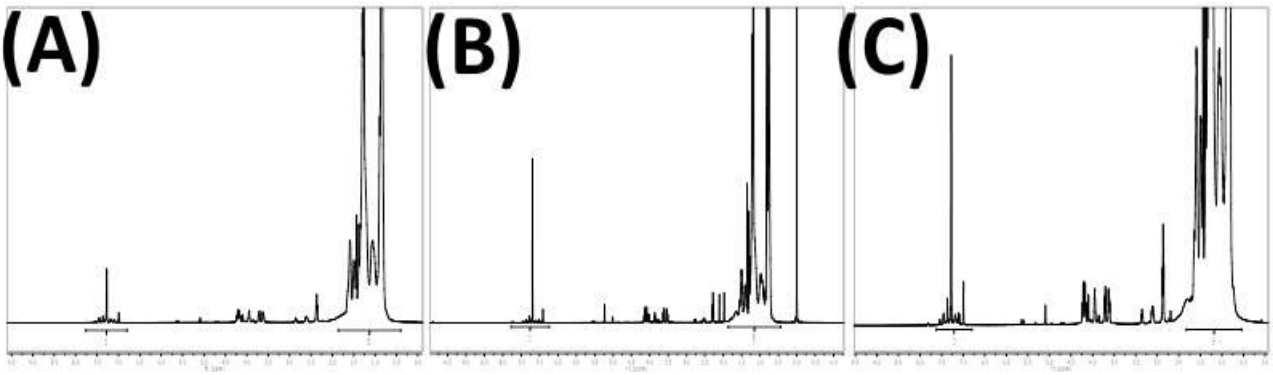



**Figure 5.** a) 28-day H-NMR result of a 4% petroleum control medium without bacteria. b) Results of 1H-NMR on the 1th day of the medium containing 4% petroleum containing bacteria. c) Results of 1H-NMR on the 28th day of the medium containing 4% petroleum containing bacteria.

## CONCLUSION

As a result of the widespread use of A.ferrooxidans in the industry, the biodegradation of petroleum and petroleum-derived materials, bioleaching and biodesulphurization of metal sulfides will bring a high return to the countries economy. For this purpose, firstly the cultivation of A. ferrooxidans is a basis for the industry. In this study presented with this perspective, primarily cultivation by using different culture medium and identification with molecular and imaging methods studies were carried out. Another aim of the present study is to show that A. ferrooxidans can be used in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil. For this purpose, A. ferooxidation was added to the media containing certain proportions of crude oil and degradation was examined by NMR technique. However, the very low amount of aromatic structures in crude oil used in the analysis with 1H-NMR restricted the effectiveness of the analysis. Therefore, the effects of A. ferroxidans on crude oil should be examined in further studies.

## REFERENCES

Baker-Austin C, Dopson M, 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. Trends in Microbiology, 15: 165-171.

Barron J L, Lueking D R, 1990. Growth and Maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* Cells. Applied and Environmental Microbiology, 56: 2801-2806.

Bhaskar S, Manu B, Sreenivasa MY, 2019. Bacteriological synthesis of iron hydroxysulfate using an isolated *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain and its application in ametryn degradation by Fenton's oxidation process. Journal of Environmental Management, 232: 236-242.

Chengying J, Ying L, Yanyang L, Xu G, Jiang L S, 2009. Isolation and characterization of ferrous- and sulfur-oxidizing bacteria from Tengchong solfataric region, China. Journal of Environmental Sciences, 21: 1247-1252.

Daoud J, Karamanev D, 2006. Formation of jarosite during Fe2+ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Minerals Engineering, 19: 960-967.

Das A, Roy P, Mishra A K, 1993. Desulphuring of natural gas and petroleum oil by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. Letters in Applied Microbiology, 16: 164-166.

Das N and Chandran P, 2010. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. Biotechnology Research International, 2011: 13.

Duga S, Gobbi A, Asselta R, Crippa L, Tenchini M L, Simonic T, Scanziani E, 1998. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of the coryneform bacterium associated with hyperkeratotic dermatitis of athymic nude mice and development of a PCR-based detection assay. Molecular and Cellular Probes, 12: 191-199.

Haktandır M 2019. Petrol kalintisinin yapi ve dönüşüm reaksiyonlarinin nitelik ve moleküler düzeyde modellenmesi. Doktora Tezi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İstanbul.

Ilieva R, Groudeva V, Iliev M, 2011. PCR Detection and 16s rDNA sequence analysis of different *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolates. Biotechnology & Biotechnological Equipment 25: 47-49.

Jensen A B, Webb C, 1995.Ferrous Sulphate Oxidation Using *Thiobacillus ferrooxidans*: a Review. Process Biochemistry, 30: 225-236.

Johnson D B and Hallberg K B, 2008. Carbon, Iron and Sulfur Metabolism in Acidophilic Micro-Organisms. Advances in Microbial Physiology, 54: 201-255.

Kumari S, Raj K, Regar K R, Manickam N, 2018. Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. Bioresource Technology, 254: 174-179.

Martın J W, Barrı T, Han X, Fedorak P M, El-dın M G, Perez L, Scott A C, Jiang J T, 2010. Ozonation of oil sands process-affected water accelerates microbial bioremediation. Environmental Science & Technology, 44: 8350-8356.

Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, Jedlicki E, Holmes D S, Bonnefoy V, 2009. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. BMC Genomics, 10: 394.

Quatrini R and Johnson D B, 2018. Microbiomes in extremely acidic environments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH. Current Opinion in Microbiology, 43: 139-147.

Peng H, Yang Y, Qiu G, Liu X, Huang J, Hu Y, 2006.Structure analysis of 16S rDNA sequences from strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, 39: 178-182.

Rosenfeld L, 1999. Four Centuries of Clinical Chemistry. CRC Press, 1999, p. 130-175.

Sajjad W, Bhattı T M, Hasan F, Khan S, Badshah M, Naseem A A, Shah A A, 2016. Characterizatıon of sulfur-oxidizing bacteria isolated from acid mine drainage and black shale samples. Pakistan Journal of Botany,48(3): 1253-1262).

Sugıura K, Ishıhara M, Shımauchı T, Harayama S, 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environmental Science & Technology, 31: 45-51.

Tena D E, Rojo N, Gurtubay L, Ezquerro A R, Lacelle L N L, Oyanguren I, Barbero F, Elias A, 2017. Biomachining: Preservation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and treatmentof the liquid residue. Engineering İn Life Sciences, 17: 382-391.

Uysal A, 2006. Ham petrol fraksiyonlarinin biyolojik bozunma sonrası fizikokimyasal özelliklerinin değişimi. Yüksek Lisans Tezi Kimya Anabilim Dalı, Isparta.

Valdes J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson R J, Tettelin H, Blake R, Eisen J, Holmes D, 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. BMC Genomics, 9:597.

Wentzel A, Ellingsen T E, Kotlar H K, Zotchev S B, Holst M T, 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. Applied Microbiology and Biotechnology, 76: 1209-1221.

Xiao C, Chı R, Fang Y, 2013. Effects of Acidiphilium cryptum on biosolubilization of rock phosphate in the presence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 23:2153-2159.

Xie Q, Yu L, Li Z, Liu H, Liu Z, Guo Z,Wu Z, Zhu H, Sun Y, Khan A, Li H, 2015. A novel method of dissolving realgar by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans.* International Journal of Mineral Processing, 143:39- 42.

Xiong and Guo, 2011. Effects of chloride acclimation on iron oxyhydroxides and cell morphology during cultivation of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Environmental Science & Technology, 45: 235–240.

Zhang S, Yan L, Xing W, Chen P, Zhang Y, Wang W, 2018. *Acidithiobacillus ferrooxidans* and potential application. Extremophiles, 22: 563-579.

San W, Gehrke T, Jozsa P G , Schippers A, 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. Hydrometallurgy, 59: 159-175.

# Preperation of a Nanostrucered Biocomposite and Analysis of Sensitivity to Heavy Metal

Leyla Aktepe[1*], Hilal İncebay[2], Zeliha Leblebici[2]

[*1] Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, Institute of Science Department of Biology Nevşehir, Turkey

[2] Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, Faculty of Arts and Sciences Department of Molecular Biology and Genetics Nevşehir, Turkey

*Corresponding author e-mail: laktepe@hotmail.com

**Abstract**

Biomaterials can be applied in many areas through their excellent integration with nanostructures, as well as being environmentally friendly. Biosensors created using plant tissue materials are alternatives of biosensors created with isolated enzymes. These biosensors are also used frequently in determination of heavy metals. Cd(II) is one of the most dangerous heavy metals and has a very high solubility in water, and it has high toxic properties even at low doses for living organisms by joining the food chain. In order to quantify the Cd(II) ions of this product with accurate, sensitive and economical methods, an electrochemical biosensor is made from the study of non-usable hybrids of the extract of green tea obtained by ethanol extraction and modification of these hybrids to glassy carbon surfaces. Modified surfaces were characterized by Scanning Electron Microscope, Fourier Transform Infrared Spectrophotometry, Cyclic Voltammetry and Differential Pulse Stripping Voltammetry techniques. The modified nanobiostructured electrodes proposed for the quantification of Cd(II) ions showed a well-defined voltammetric response with a high catalytic activity in pH 4.5 PBS solution.

**Keywords:** Heavy metal, bioextract, hybrid systems, nanosensor.

## INTRODUCTION

Technological developments and rapid population growth in the world increase the needs of human beings. This situation has brought rapid developments in the industrial field (Pereira and Romero, 2017). The rapid development of the industry has caused the environmental pollution to increase rapidly. Soil, air, water contaminated with the environment have negatively affected the living areas and human health of all living things (Cushen et al., 2012). One of the biggest causes of environmental pollution is heavy metals emitted from industrial wastes to the environment. These heavy metals are taken into the human body by means of digestion, respiration and skin (Liu et al., 2013). Behavior disorders, irregular nervous system disorders and many metabolism problems can be seen in people with heavy metal exposure. According to the heavy metal that people are exposed to, serious health problems also arise such as organ failure and various injuries (Hauret et al., 2010; Rehman et al., 2018) These heavy metals can reach from soil to water, from water to plants, from plants to humans and pose a danger to all living creatures. In recent years, interest in sensitive, reliable and rapid determination methods (such as spectroscopic, voltammetric or chromatographic methods etc.) has increased significantly in the determination of heavy metals (Mehta et al., 2016; Bansod et al., 2017). There is also an increase in interest in sensor designs sensitive to heavy metals found in soil, water, sediment and foodstuffs. Biosensors have many advantages such as being fast, low cost, portable and simple and fast sample preparation compared to traditional analytical techniques (Naleway et al., 2015; Barthelat et al., 2016). The design of the sensor technology with nanostructures and biological materials is of great importance both economically and sensitively. Due to these advantages, different biosensors are developed in many fields and their application areas are increased. In particular, biosensor materials created with extract structures obtained from biological materials have the ability to absorb heavy metals (Pasdaran et al., 2017; Sun et al., 2015).
In this study, a biosensor design was realized by combining the extract obtained from biological materials with nanostructures and its sensitivity to heavy metals was examined by voltammetric methods.

## MATERIALS AND METHODS

*Chemical Reagents and Instrumentation*

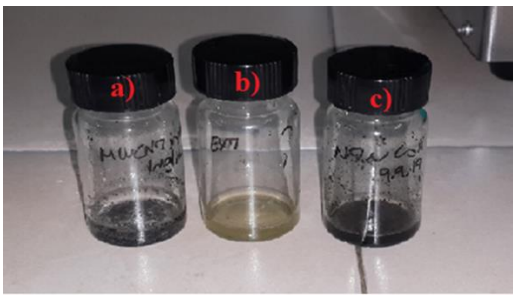
Potassium dihydrogen, ferrocene and sodium phosphate dibasic dodecahydrate were purchased from Sigma. Potassium ferricyanide and sodium acetate were obtained from Merck. Cadmium chloride was purchased from Alfa Aesar. The solutions were prepared with ultrapure water. An Interface 1000B Potentiostat/Galvanostat/ZRA was used for the application of cyclic voltammetry and differential pulse stripping voltammetry techniques in the electrochemical characterization and electrochemical application experiments.

*Extraction of Biological Material*

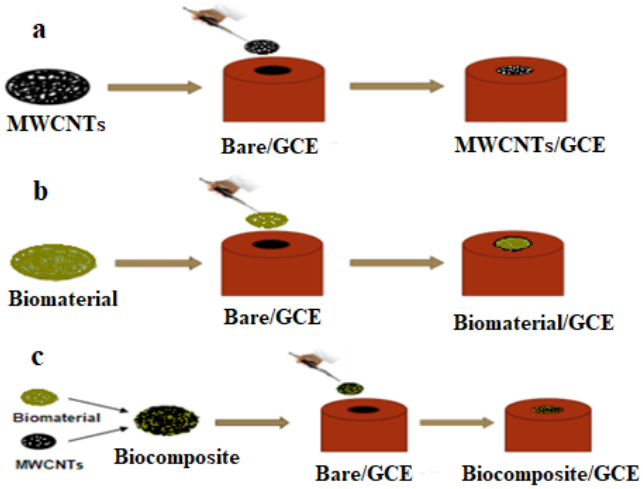
The dried green tea plant was extracted with 150 mL ethanol at $30^0$C using the Soxhlet extractor. The obtained extract solution was centrifuged at 5000 rpm.

*Preparation of Nanostrucered Biocomposite*

GC electrode was cleaned 0.05 µm and 0.30 µm of alumina powder. The MWCNTs were functionalized in an acid mixture of $HClO_4$ + $HNO_3$ (3:7, v:v) (Baytak and Aslanoglu, 2017). The functionalized MWCNTs and biological extract were sonicated for 45 min in ultrapure water (Scheme 1). This obtained suspension was dropped on cleaned GC electrode and Biocomposite/GC was prepared by drying at the room temperature (Scheme 2).




**Scheme 1.** a) MWCNTs, b) Biomaterial, c) Biocomposite suspensions




**Scheme 2.** Preparation of **a)** MWCNTs/GCE **b)** Biomaterial/GCE **c)** Biocomposite/GCE surfaces

*Characterization of nanostructured biocomposite surfaces.*

Electrochemical behavior tests were performed by cyclic voltammetry at MWCNTs/GCE, Biomaterial/GCE, Biocomposite/GCE surfaces in potassium ferricyanide and ferrocene probes.

*Analytical application of nanostructured biocomposite*

The sensitivity of nanostructured biocomposite/GCE surface to heavy metal was investigated by differential pulse stripping voltammetry in pH=4.5 PBS.

## RESULTS and DISCUSSION

*Biomaterial characterization*

The SEM image and FTIR spectrum of the bioextract obtained from green tea are given in Figure 1. The certain characteristic infrared spectrum bands (C = C, C-O, C-C, C = 0) showed that the molecules in the biomaterial had different chemical functions (Figure 1A) (Dali et al., 2018). It was observed from the SEM image of the biomaterial that the structure had a homogeneous morphology (Figure 1B).

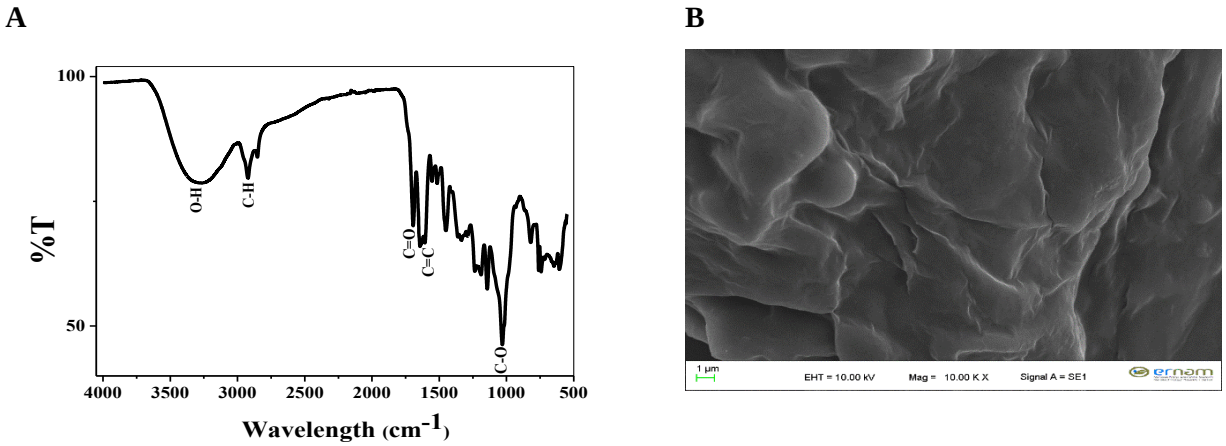



**Figure 1.** A) FTIR spectrum, B) SEM image of the biomaterial

*Electrochemical characterization of nanostructured biocomposite*

Electrochemical responses of Bare/GCE, MWCNTs/GCE, Biomaterial/GCE, Biocomposite/GCE surfaces are given in Figure 2 with cyclic voltamograms taken in ferricyanide and ferrocene probes. Voltamograms taken in probes were evaluated by comparing MWCNTs/GCE, biomaterial/GCE, biocomposite/GCE surfaces with bare/GCE surface. When the voltamograms given in Figure 1A were examined, it was observed that the Bare / GCE and MWCNTs/GCE surfaces allowed electron transfer for the reduction/oxidation reactions of the ferricyanide probe, while the Biomaterial/GCE and Biocomposite/GCE surfaces did not allow electron transfer. This is due to the functional groups that negatively affect the electron transfer properties in the structure of the biomaterial (İncebay and Yazıcıgil, 2017). The voltamograms of the ferrocene probe in Figure 1B showed that Bare/GCE, MWCNTs/GCE, Biomaterial/GCE, Biocomposite/GCE all allow electron transfer. The observation of the highest electron transfer on the Biocomposite/GCE surface can be attributed to the increase in the electrolytic effect of nanostructures (Dedelaite et al., 2015).

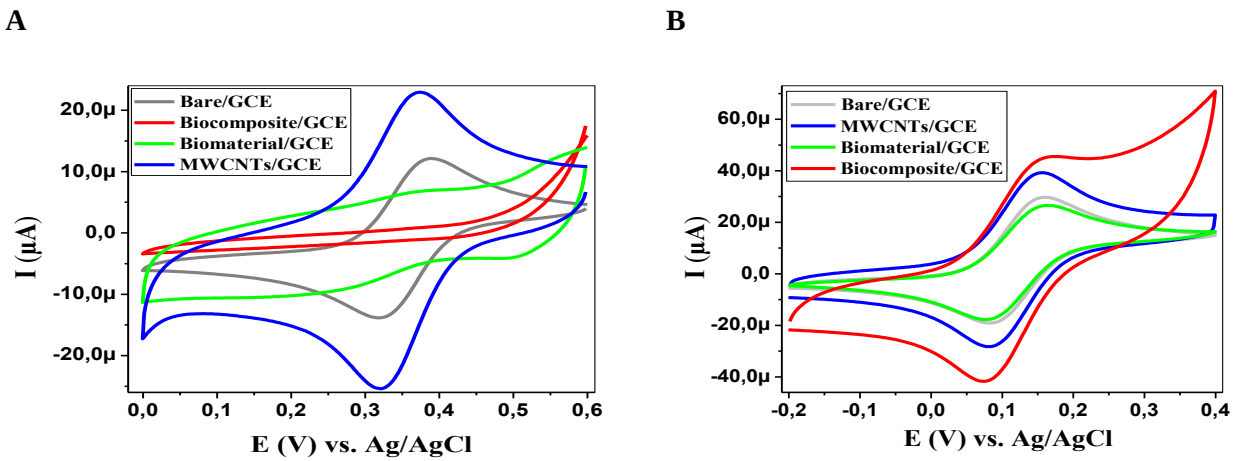



**Figure 2.** Cyclic voltamograms taken in **A)** Ferricyanide and **B)** Ferrocene probe at Bare/GCE, MWCNTs/GCE, biomaterial/GCE, biocomposite/GCE surfaces.

Figure 3A and 3B show the voltamograms were recorded at different scan rates using the cyclic voltammetry in the ferrocene probe to examine the electrochemical behavior such as reversibility, semi-reversibility, irreversibility, adsorption properties of the biocomposite/GCE surface. However, the parameters for peak currents and scan rates for Bare/GCE and Biocomposite/GCE surfaces at different scan rates are given in Figure 3C and 3D. Peak currents of Bare/GCE and Biocomposite/GCE surfaces showed a linear increase with increasing scan rates. In Figure 3C, it was observed that the $R^2$ values of the graph obtained from the anadic peak currents against the square root of the scan rates were close to 1 on the Bare/GCE (0.9997) and Biocomposite/GCE (0.9978) surfaces. This supports a reversible reaction on the surfaces (İncebay 2018;Deshmukh et al., 2018). Also in Figure 3.D, it was observed that the slopes of the graphs obtained from the logarithm of peak currents against logarithm of the scan rates of Bare/GCE (0.4571) and biocomposite/GCE (0.5873) surfaces were less than 0.5 and close to 0.5. This indicates that a diffusion-controlled reaction has occurred on the surfaces (Deshmukh et al., 2017).

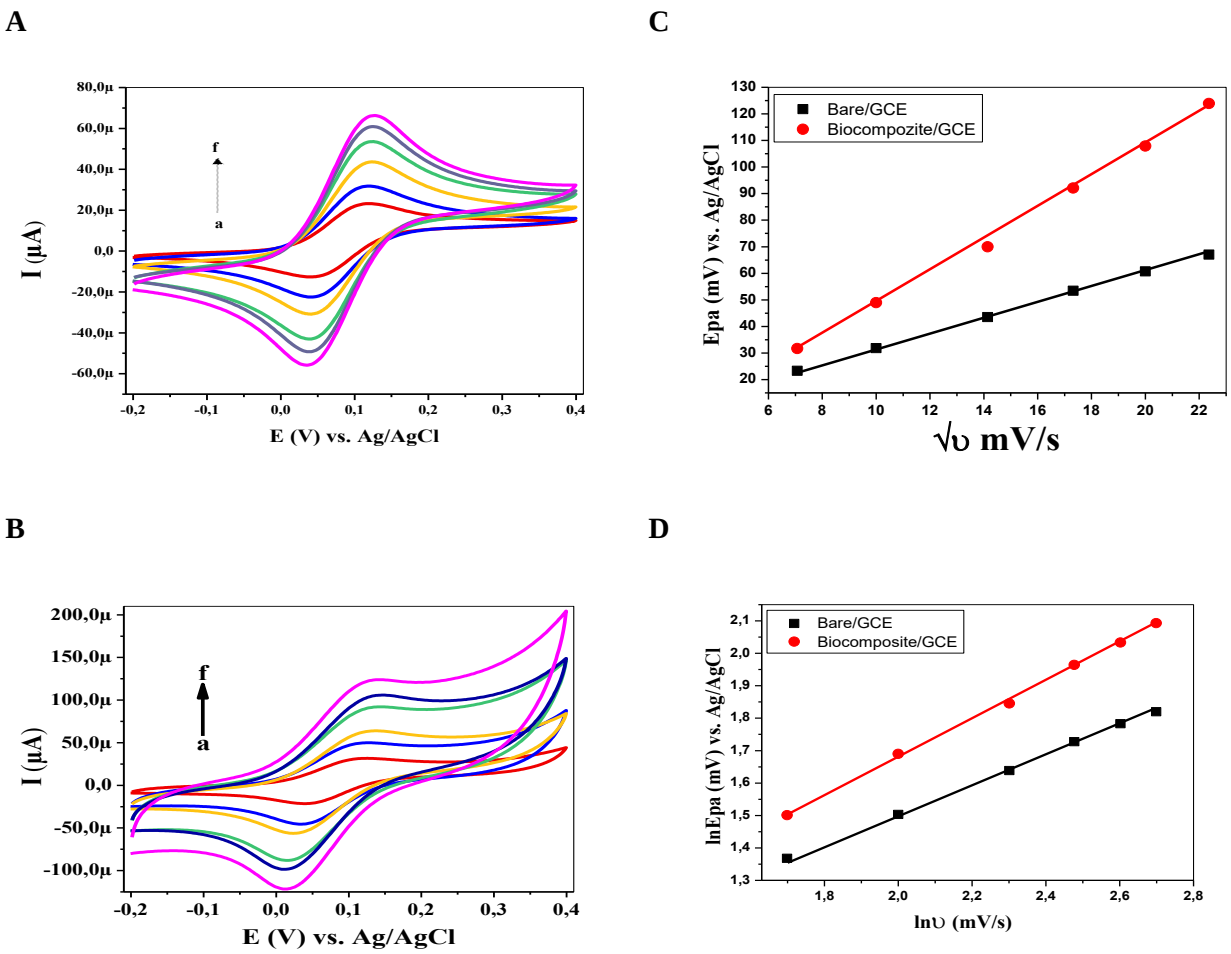



**Figure 3.** Voltamograms of **A)** the Bare/GCE surface **B)** Biocomposite a) 50; b) 100; c) 200; d) 300; e) 400; f) 500; at scan rates against the $Ag/AgNO_3$ reference electrode in a 1 mM ferrocene solution.
**C)** A plot of anodic peak current versus the square root **D)** A plot of logarithm of anodic peak current versus the logarithm of scan rates at Bare/GCE and Bicomposite/GCE.

*Analytical application*

For analytical application of the Biocomposite/GCE surface, the sensitivity to heavy metals was investigated by differential pulse stripping voltammetry. The surface was observed to show high sensitivity and selectivity.

## CONCLUSION

Biomaterial was obtained from the extraction method, which is a very fast, easy and inexpensive technique from the biological material for the design of the biosensor. In addition, the electroactive biomaterial was treated with carbon nanotubes, thereby further increasing its electroactivity. It has been determined that a diffuse controlled and reversible electrochemical reaction takes place on the proposed Biocomposite/GCE

surface. This surface, which has high electroactivity, showed high sensitivity to heavy metals. However, it can be suggested that the proposed biosensor can also be used for the determination of a large number of electroactive components. The main conclusions should be summarized here, and can also include recommendations or suggest application of the results beyond the study.

**REFERENCES**

Bansod BK, Kumar T, Thakur R, Rana S, Singh I 2017. A Review on Various Electrochemical Techniques for Heavy Metal Ions Detection with Different Sensing Platforms. Biosensors and Bioelectronics. 94: 443-455.

Barthelat F, Yin Z and Buehler MJ 2016. Structure and Mechanics of Interfaces in Biological Materials. *N*ature Reviews Materials. 1-4: 1-16.

Baytak AK, Aslanoglu M 2017. Sensitive Determination of Capsaicin in Pepper Samples Using a Voltammetric Platform Based on Carbon Nanotubes and Ruthenium Nanoparticles. Food Chemistry, 228: 152–57.

Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M, Cummins E 2012. Nanotechnologies in the Food Industry - Recent Developments, Risks and Regulation. Trends in Food Science and Technology. 24(1): 30-46.

Dali M, Zinoubi K, Chrouda A, Abderrahmane S, Cherrad S, Jaffrezic-Renault N 2018. A Biosensor Based on Fungal Soil Biomass for Electrochemical Detection of Lead (II) and Cadmium (II) by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry. Journal of Electroanalytical Chemistry. 813: 9-19.

Dedelaite L, Kizilkaya S, Incebay H, Ciftci H, Ersoz M, Yazicigil Z, Oztekin Y, Ramanaviciene A, Ramanavicius A 2015. Electrochemical Determination of Cu(II) Ions Using Glassy Carbon Electrode Modified by Some Nanomaterials and 3-Nitroaniline. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 483: 279–84.

Deshmukh MA, Celiesiute R, Ramanaviciene A, Shirsat MD, Ramanavicius A 2018. EDTA_PANI/SWCNTs Nanocomposite Modified Electrode for Electrochemical Determination of Copper (II), Lead (II) and Mercury (II) Ions. Electrochimica Acta, 259: 930–38.

Deshmukh, MA, Gicevicius M, Ramanaviciene A, Shirsat MD, Viter R, Ramanavicius A 2017. Hybrid Electrochemical/Electrochromic Cu(II) Ion Sensor Prototype Based on PANI/ITO-Electrode. Sensors and Actuators, B: Chemical, 248: 527–35.

Hauret KG, Jones BH, Bullock SH, Canham-Chervak M, Canada S 2010. Musculoskeletal Injuries: Description of an under-Recognized Injury Problem among Military Personnel. American Journal of Preventive Medicine, 38: 561–70.

İncebay H 2018. A Sensitive Quantification of Agmatine Using a Hybrid Electrode Based on Zinc Oxide Nanoparticles. Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry, 5(3): 1205–1214.

İncebay H, Yazıcıgil Z 2017. Effect of Different Copper Salts on the Electrochemical Determination of Cu(II) by the Application of the Graphene Oxide-Modified Glassy Carbon Electrode. Surfaces and Interfaces, 9: 160–66.

Liu X, Song Q, Tang Y, Li W, Xu J, Wu J, Wang F, Brookes PC 2013. Human Health Risk Assessment of Heavy Metals in Soil-Vegetable System: A Multi-Medium Analysis. Science of the Total Environment, 463–464: 530–40.

Mehta J, Bhardwaj SK, Bhardwaj N, Paul AK, Kumar P, Kim KH, Deep A 2016. Progress in the Biosensing Techniques for Trace-Level Heavy Metals. Biotechnology Advances. *34*(1), 47-60.

Naleway SE, Porter MM, McKittrick J, Meyers MA 2015. Structural Design Elements in Biological Materials: Application to Bioinspiration. Advanced Materials, 27(37): 5455–76.

Pasdaran A, Delazar A, Ayatollahi SA, Pasdaran A 2017. Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR 16 (1): 338–46.

Pereira AC, Romero F 2017. A Review of the Meanings and the Implications of the Industry 4.0 Concept. Procedia Manufacturing, 13: 1206–14.

Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH 2018. Prevalence of Exposure of Heavy Metals and Their Impact on Health Consequences. Journal of Cellular Biochemistry, 119 (1): 157–84.

Sun J, Liang Q, Han Q, Zhang X, Ding M 2015. One-Step Synthesis of Magnetic Graphene Oxide Nanocomposite and Its Application in Magnetic Solid Phase Extraction of Heavy Metal Ions from Biological Samples. Talanta, 132: 557–63.

# Cobalt-Embedded Poly(3-Methyl Thiophene) Film as Electrocatalyst Toward Hydrogen Evolution Reaction

Emine Ülker

Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of Arts & Sciences, Department of Chemistry, Rize, Turkey

*Corresponding author e-mail: emine.kapancik@erdogan.edu.tr

**Abstract**
Reserves of the fossil-based fuels have been depleting rapidly and these fuels have also cause some environmental problems. Therefore, significant efforts have been dedicated to improving clean energy and recyclable conversion technologies. Among them, water splitting system, including the generation of $H_2$ and $O_2$ is promising way to supply sustainable and green energy technology. Using the noble metal-based catalysts for produce hydrogen is considered to be the bottleneck in this area. Therefore, replacement of this noble metal with abundant and cheaper metal-based catalysts have been intensively studied. Metallized polymers which is prepared by electrochemical reduction of metal ions on the polymeric surface are simple way to obtained metal-based catalysts. Herein, cobalt metal has been electrodeposited on poly(3-methyl thiophene) (P3MT) surface. The metal layer was deposited in two steps. Firstly P3MT was electrodeposited on electrode surface, then, Co was coated on the surface of P3MT by applied constant potential in $CoCl_2$ solution. Cobalt-incorporated film was used as electrocatalyst toward hydrogen evolution reaction with overpotential of 580 mV at current density of 10 mA $cm^{-2}$ and Tafel slope 126 mV $dec^{-1}$.

**Keywords:** Cobalt, 3-methyl thiophene, hydrogen evolution, conductive polymer, electrocatalyst

## INTRODUCTION

The reserves of fossil-based fuels have been depleting rapidly, also, these fuels cause some environmental problems (Hoffert et al. 1998; Lewis and Nocera 2006). Therefore, significant efforts have been dedicated to develop clean energies and recyclable conversion and storage technologies (Huang et al. 2019). Hydrogen appears to be an ideal energy carrier in the future because of its high energy density and environmentally friendly combustion product (Schlapbach and Züttel 2001; Durbin and Malardier-Jugroot 2013). Water splitting is one of the most promising way for evolution of hydrogen. The important thing is the more efficient and economical catalysts are needed to reduce the cell voltage. Although platinum-based catalysts are widely used electrocatalyst for hydrogen evolution reactions, natural scarcity, high price and low stability of these catalysts obstruct for their large-scale application. Therefore, many research groups are working on new catalysts, cyanide-based systems (Alsaç et al., 2018), metallopolymers (Kap et al., 2018), metal sulfides (Pan et al., 2015; Merki et al., 2011), non-noble metal oxide (Wang et al., 2015), that can be used in this field.
The conductive polymers, especially polyaniline (PANI), polypyrrole (PPy) and polythiophene (PTh) have gained significance due to high electrochemical stability, high conductivity and simple preparation in electrocatalysis (Aydin et al., 2006; Dong et al., 2017). Electrode materials with conductive polymers have some advantage: i) their porous structure increases electrode surface area, ii) heteroatom in their structure, such as N, S can be used to dope electrode material for increasing hydrogen evolution reaction (HER) electrocatalytic performance. Also, metallized polymers which is prepared by electrochemical reduction of metal ions on the polymeric surface are simple way to obtained metal-based catalysts. The high stability of these polymers makes them appealing candidates for the improvement of new catalytic systems including of metallic mass (Tourillon and Garnier 1984). The promising strategy is the development carbon supports with conductive polymers as substrate to include metal-metal oxide particles to obtain better performance towards HER. Among them, P3MT is rarely investigated for electrocatalyst on HER. It can be synthesized directly oxidation of the monomer in the presence of a dopant anion on different electrodes and used various application, such as sensors (Wang et al. 2006; Kavanoz et al. 2015), batteries (Ju et al. 2007) and supercapacitor (Sivaraman et al. 2020). Recently, electrocatalyst based on conducting polymer is widely used for HER due to high aptitude of driving electron-transfer and good electrical conductivity (Feng et al. 2015; Dong et al. 2017). However, conducting polymers with heteroatom, such as polypyridine and polyaniline were utilized for doping N atom to carbon based materials to improve the catalytic performance (Huang et al. 2019)

In the present work, P3MT conductive polymer was synthesized by in-situ oxidative polymerization method and the cobalt particles were coated over P3MT through a simple electrochemical process. Co_P3MT composite was investigated to evaluate electrochemical performance towards HER in neutral medium. Active cobalt site on electrode surface with and without P3MT was calculated.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Solutions

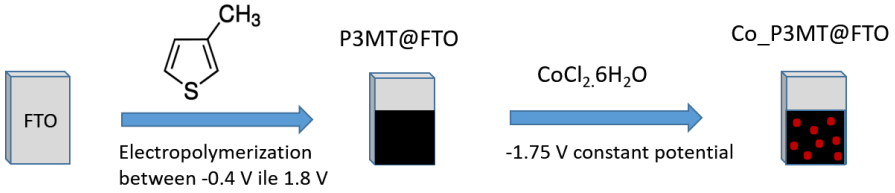
All chemicals including 3-methyl thiophene, cobalt chloride hexahydrate ($CoCl_2.6H_2O$), potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$, >99.0%), dipotassium hydrogen phosphate ($K_2HPO_4$, >99.0 %), potassium hydroxide (KOH), phosphoric acid ($H_3PO_4$), fluorine-doped tin oxide (FTO) covered glass plates and solvents were supplied from Merck and Aldrich and used as received. Potassium phosphate buffer (0.05 M KPi, pH 7.0) including 1 M $KNO_3$ as electrolyte was prepared using $K_2HPO_4$, $KH_2PO_4$, $KNO_3$, and deionized water and then set by adding $H_3PO_4$ or KOH to the preferred pH. Solutions were prepared with Millipore Milli-Q deionized water with a resistivity of 18.2 MΩ cm.

### Instrumentation

Powder Xray diffraction (XRD) patterns were performed using Rigaku SmartLab X-Ray Diffractometer. Scanning electron microscopy (SEM) image (Rigaku Jeol JSM-6610) and energy-dispersive X-ray (EDX) analysis (Oxford Instruments 51-Add0013) were directly taken by using over polymer films coated FTO electrode. Overall electrocatalytic experiments were performed by Gamry potentiostat/galvanostat device (Instrument Interface 1000) at room temperature. A traditional three-electrode electrochemical setup was used with catalyst loaded FTO (referred as Co_P3MT@FTO) as a working electrode, Pt as a counter electrode and Ag/AgCl electrode (sat. KCl) as the reference electrode for electrocatalytic studies. All potentials were recorded vs Ag/AgCl reference electrode and were converted vs the reversible hydrogen electrode (RHE) scale using $E_{(RHE)} = E_{(Ag/AgCl)} + 0.197 + 0.059\times$ pH. Linear sweep voltammograms (LSV) were performed with a sweep rate of 1 mV $s^{-1}$ in KPi solution between 0V and 0.7V vs RHE reference electrode. Chronopotentiometric (CP) experiment was performed at a constant current density of 10 mA $cm^{-2}$ in KPi solution without stirring. Overall measurements were carried out under a nitrogen atmosphere.

### Preparation of Co_P3MT@FTO electrode

Co_P3MT is deposited under two different steps on FTO surface. First, P3MT film was synthesized potantiodynamically on FTO electrode between -0.4 V and 2V (Ag/AgCl) potential range in nonaqueous acetonitrile solution containing 0.5 M 3-methyl thiophene (3MT) monomer and 0.10 M tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as electrolyte. Then, Co was coated on P3MT@FTO by applied -1.75 V constant potential in acetonitrile solution containing 10 mM $CoCl_2.6H_2O$. The fabricated process was schematically demonstrated in Scheme 1.




**Scheme. 1** Schematic illustration of synthetic route of Co_P3MT@FTO electrode

**Calculation of surface concentration:** Active cobalt center onto electrode surface, i.e; surface concentration ($\Gamma_0$) was calculated from the linear relationship between the oxidation peak current of $Co^{2+/3+}$and sweep rate is obtained from the electrochemical CV scans. Surface concentration ($\Gamma_0$) can be calculated from slope of this plot.

### Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Experiment

Impedance spectroscopy experiments were performed with Gamry potentiostat-galvanostat (Instruments Interface 1000) at -0.24 V (vs. RHE) with an initial conditioning for 5 min under HER working conditions. The experiments were carried out in the frequency range of 0.01 to 100 kHz with an alternating current (AC) signal of 5.0 mV.

## RESULTS and DISCUSSION

Figure 1A depicts the cyclic voltammogram performed throughout the deposition of P3MT on the FTO electrode between -0.4 and 2 V vs Ag/AgCl (non-aqueous) in acetonitrile solution containing 0.5 M 3MT monomer and 0.10M TBAP. As shown in the Figure 1A, all voltammetric peak currents elevated linearly with each cycle showing the growth of the film. P3MT@FTO electrode were dipped into acetonitrile to take out adsorbed monomer, electrolyte, and the soluble oligomers occurred during electrodeposition of the P3MT films. After this step, Co metal was coated on P3MT@FTO electrode by chronopotentiometry with applying -1.75 V constant potential in acetonitrile solution containing 10 mM $CoCl_2.6H_2O$ (Figure 1B), referred to as Co_P3MT@FTO. In addition, to compare the electrocatalytic activity, Co metal was coated on FTO electrode, which is not contain P3MT as specified in the second step, referred to as Co@FTO.

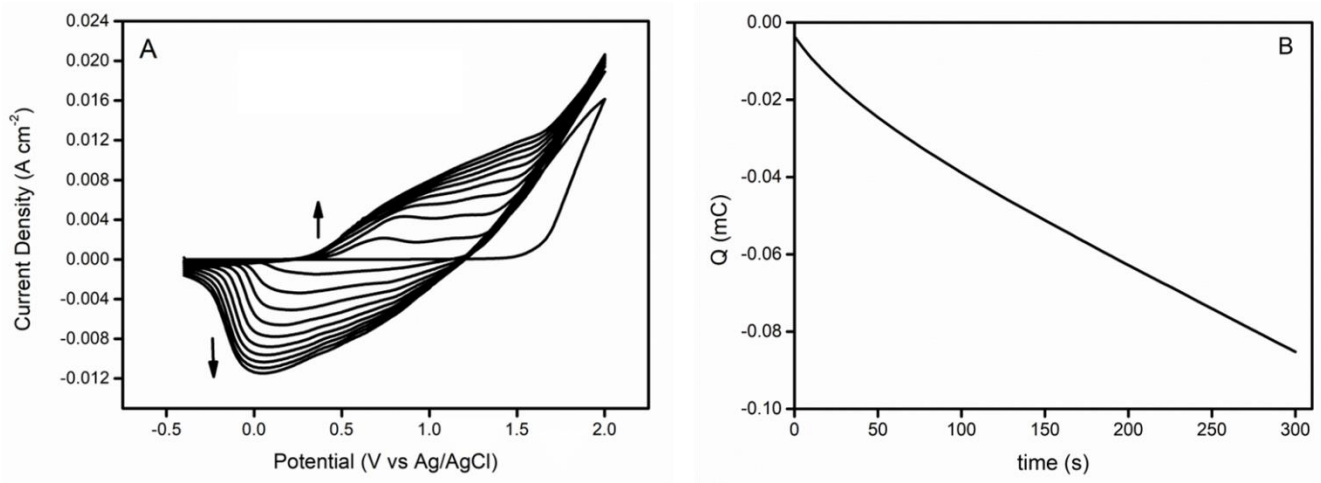



**Figure 1.** A) Cyclic voltammogram taken during potentiodynamically deposited P3MT film on FTO electrode B) Controlled potential electrolysis at - 1.75 V to deposit Co metal on P3MT@FTO electrode

As-prepared electrodes morphologies were identified by scanning electron microscopy (SEM). SEM image of P3MT@FTO electrode is shown in Figure 2A, which shows that P3MT film has porous structure as expected. Co@FTO electrode has bright dots demonstrated the formation of Co on FTO electrode (Figure 2B). SEM image of Co_P3MT@FTO also shows clustered morphology of metal particles randomly arranged over porous structure of P3MT film (Figure 2C). The chemical component of electrodes were determined by using EDX mapping method (Figure 2D-F). The observation of Co and S in the film detected in EDX spectra of Co_P3MT@FTO proves that the structure was successfully obtained. The lack of crystalline structures in the X-ray powder diffraction pattern indicates the amorphous nature of Co_P3MT@FTO, as shown in Figure 3.

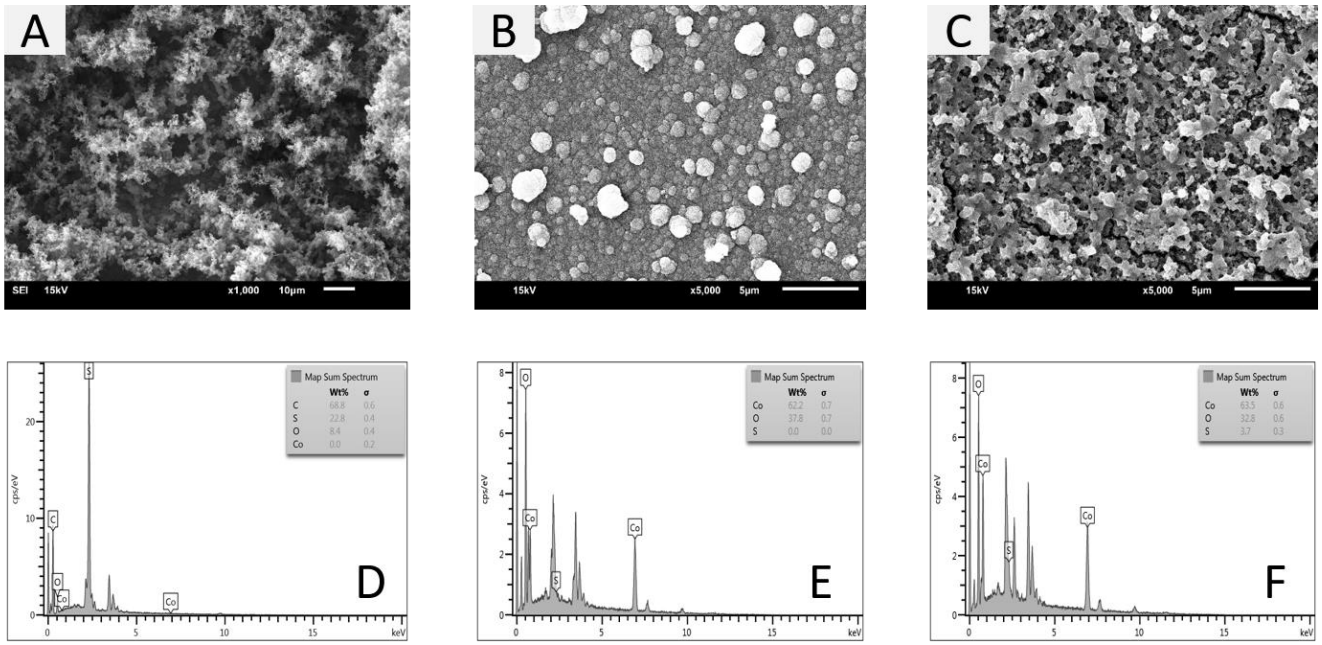



**Figure 2.** SEM image of A) P3MT@FTO B) Co@FTO and C) Co_P3MT@FTO electrodes EDX spectrum of D) P3MT@FTO E) Co@FTO and F) Co_P3MT@FTO electrodes

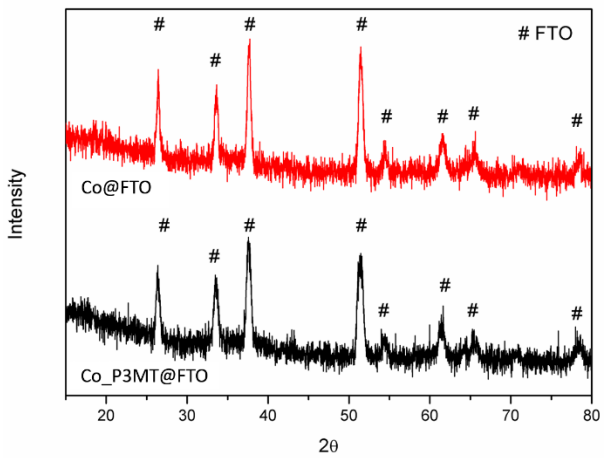



**Figure 3.** XRD of Co@FTO (red) and Co_P3MT@FTO (black)

Electrocatalytic studies of electrode was performed by LSV with scan rate of 1 mV $s^{-1}$ in KPi solution (pH 7). Figure 4A depicts the LSV comparison of Co_P3MT@FTO electrode with blank FTO and Co@FTO electrodes. As seen Figure 4A, Co_P3MT@FTO exhibits HER activity with a catalytic onset potential of 236 mV is necessary to generate a current density of 55 µA $cm^{-2}$ and the Tafel slope of 126 mV $dec^{-1}$ was reproduced from LSV analysis at a low sweep rate. In addition, Co@FTO electrode has higher Tafel slope (165 mV $dec^{-1}$) (Figure 4B). Less Tafel slope demonstrates faster kinetics for the HER on Co_P3MT@FTO electrode. In addition, from the Tafel plot a multistage reaction process, which can be achieved with two feasible mechanisms: Volmer–Tafel or Volmer–Heyrovsky was predicted for HER. The first step is the same for both mechanisms proton discharge to generate adsorbed H onto active cites of catalyst (Volmer step, 120 mV $dec^{-1}$). Then, it is followed by either chemical desorption, which is two absorbed protons recombine to form $H_2$ (Tafel step, 30 mV $dec^{-1}$) or electrochemical desorption, which is adsorbed hydrogen atoms combine with another proton in the solution to produce $H_2$ (Heyrovsky step, 40 mV $dec^{-1}$) (Gupta et al. 2016). Tafel slope is indicative to define the reaction stages in HER and the rate determining step. Tafel slope of 126 mV $dec^{-1}$ indicates Volmer–Heyrovsky mechanism of hydrogen evolution on Co_P3MT@FTO and the water discharge stage (Volmer step) seems to be rate limiting step during the HER (Masa et al. 2016).

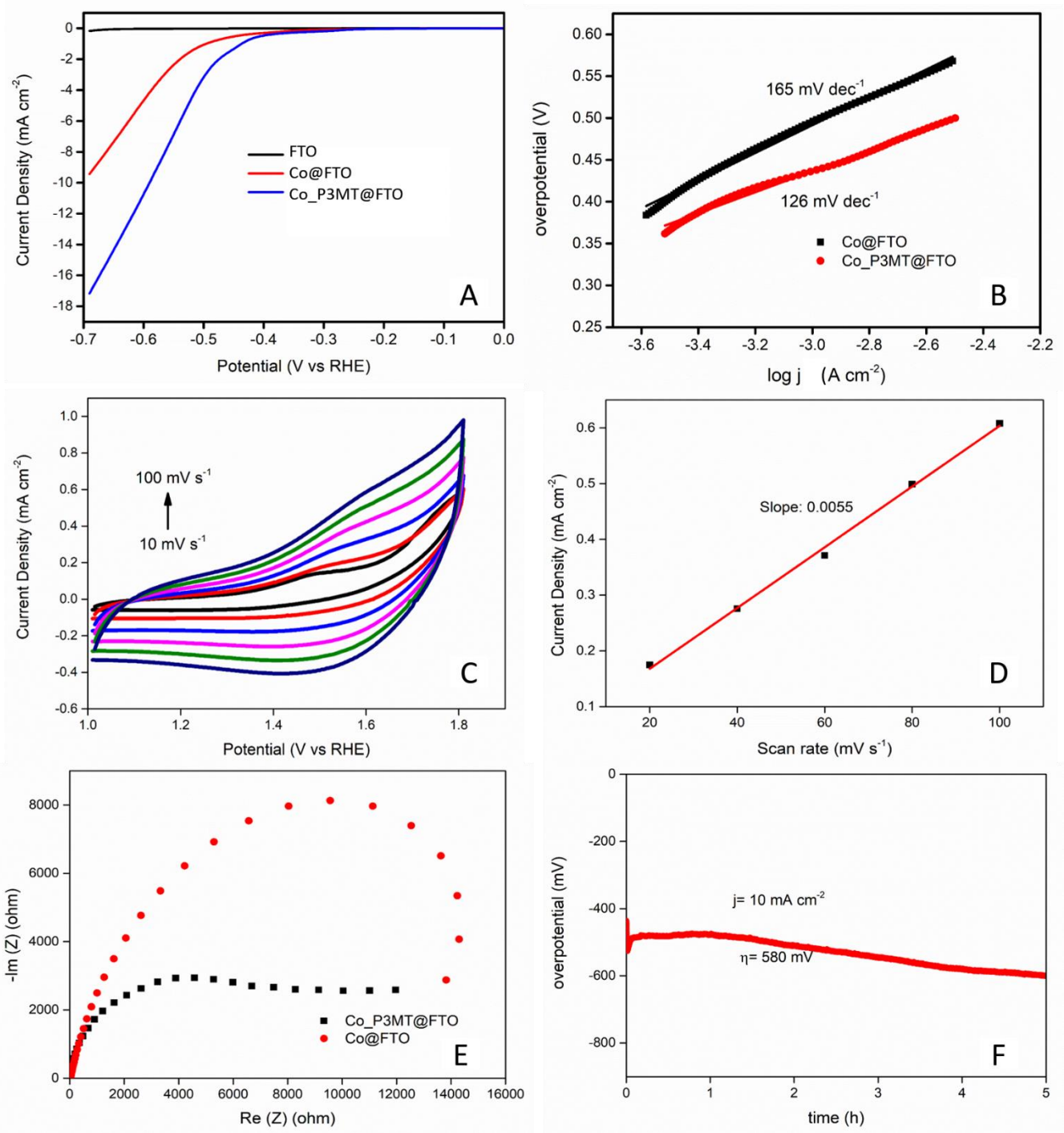



**Figure 4.** A) LSV curves of Co@FTO (red), Co_P3MT@FTO (blue) and blank FTO (black) electrodes taken in buffer solution (0.05 M KPi with 1 M $KNO_3$) as electrolyte at pH 7.0 with a scan rate of 1 mV $s^{-1}$, B) Tafel plot for Co_P3MT@FTO (red) and Co@FTO (black) derived from the LSV curve, C) CV of Co_P3MT@FTO performed different sweep rates between 10 $mVs^{-1}$ to 100 mV $s^{-1}$ in KPi solution, D) Linear correlation of the current density for oxidation peak vs sweep rate, E) Nyquist plot performed at -0.24 V (vs. RHE), F) Overpotential vs duration of Co_P3MT@FTO under a fixed current intensity of 10 mA $cm^{-2}$ at pH 7.

The overpotential at 10 mA $cm^{-2}$ was found to be 580 mV for Co_P3MT@FTO, which is smaller than achieved with Co@FTO (η>690 mV). This value is comparable to the results previously reported $Co_3O_4$/Ppy/MWCNT catalyst (η=490 mV) (Jayaseelan et al. 2020) and $Cu_3P$ (η=519 mV)(Patel et al. 2018).

Exchange current density ($j_0$) is important electrochemical parameter could be extracted from Tafel plot at an overpotential of 0 V. Current density change for Co_P3MT@FTO in pH 7 was determined to be $3.3\times10^{-4}$ mA $cm^{-2}$, which is similar with $MoS_3$ ($j_0=8.9\times10^{-4}$ mA $cm^{-2}$) at pH 7 (Merki et al. 2012).

Also, to see the effect of the porous structure of P3MT, $\Gamma_0$ meaning the redox active $Co^{2+}$ metal center onto the electrode surface, was calculated. CVs at different sweep rates were performed in KPi solution in the region of $Co^{2+/3+}$ redox couple (Figure 4C). The $\Gamma_0$ of active metal center was obtained as 5.8 nmol $cm^{-2}$ from the slope as described in the literature (Nune et al., 2017), which is almost 1.6 times higher than that Co@FTO ($\Gamma$ = 3.7 nmol.$cm^{-2}$). The surface concentration, determined as 5.8 nmol $cm^{-2}$, was used to identify the turnover frequency (TOF) for Co_P3MT@FTO. A TOF value extracted from Tafel plot for 250 mV overpotential of was 0.065 $s^{-1}$, which is better than that informed for Co-cat (0.022 $s^{-1}$ at 385 mV) (Cobo et al. 2012) and Co–S film (0.017 $s^{-1}$) (Sun et al. 2013) at pH 7.0. This improvement of surface concentration was well supported with EIS studies performed at -0.24 V (vs. RHE), as presented in Figure 4E. The small semi-circle of Co_P3MT@FTO exhibits a lower charge transfer resistance ($R_{ct}$), which is connected to the kinetics of electrocatalysis. Smaller value of $R_{ct}$ suggests a more rapidly reaction rate. This result is also consistent with lower Tafel slope. It can be said that porous structure of P3MT increases the surface concentration, thereby, electrocatalytic activity. Also, the Nyquist plots display that electronic conductivity of Co_P3MT@FTO are improved by coating P3MT film on the surface of FTO electrode.

Stability of Co_P3MT@FTO electrode was examined by chronopotentiometry method; the time-dependent voltages at applied constant current density of 10 mA $cm^{-2}$ for 5 hours at pH 7 was given in Figure 4F. The overpotential remained with a small change for 5 h and it exhibits overpotential of 580 mV for current density of 10 mA $cm^{-2}$, which is compatible with attained from LSV.

## CONCLUSION

In summary, heterogeneous electrocatalysis including transition metal doped conductive polymer (Co_P3MT @ FTO) was synthesized by electrodeposition with two steps. The catalyst was used as an electrocatalyst for HER in 0.05 M Kpi (pH 7) solution. Co_P3MT@FTO catalyst shows catalytic efficiency for HER with an onset potential of 236 mV (vs. RHE) in neutral media, the catalyst can deliver a catalytic current of 10 mA $cm^{-2}$ at 580 mV with a Tafel slope of 126 mV $dec^{-1}$ which exhibits that Volmer-Heyrovsky mechanism works for HER and Volmer step seems to be rate limiting step during the HER. Since the P3MT conductive polymer has more porous structure, it was used to increase the electrode surface area. It was observed that with the addition of P3MT, the count of active Co centers over the electrode surface increased approximately 1.6 times. Co_P3MT@FTO is notable for the due to it is effortlessly fabricated by electroreduction of modest divalent cobalt salts.

## REFERENCES

Alsaç EP, Ulker E, Nune SVK, Karadas F. 2018. A Cyanide-Based Coordination Polymer for Hydrogen Evolution Electrocatalysis. Catal Letters. 148:531–538.

Aydin R, Köleli F. 2006. Hydrogen evolution on conducting polymer electrodes in acidic media. Prog Org Coatings. 56:76–80.

Cobo S, Heidkamp J, Jacques P-A, Fize J, Fourmond V, Guetaz L, Jousselme B, Ivanova V, Dau H, Palacin S, Fontecave M, Artero V. 2012. A Janus cobalt-based catalytic material for electro-splitting of water. Nat Mater. 11:802–807.

Dong YT, Feng JX, Li GR. 2017. Transition Metal Ion-Induced High Electrocatalytic Performance of Conducting Polymer for Oxygen and Hydrogen Evolution Reactions. Macromol Chem Phys. 218:1–9.

Durbin DJ, Malardier-Jugroot C. 2013. Review of hydrogen storage techniques for on board vehicle applications. Int J Hydrogen Energy. 38:14595–14617.

Feng JX, Ding LX, Ye SH, He XJ, Xu H, Tong YX, Li GR. 2015. Co(OH)2@PANI Hybrid Nanosheets with 3D Networks as High-Performance Electrocatalysts for Hydrogen Evolution Reaction. Adv Mater. 27:7051–7057.

Gupta S, Patel N, Fernandes R, Kadrekar R, Dashora A, Yadav AK, Bhattacharyya D, Jha SN, Miotello A, Kothari DC. 2016. Co-Ni-B nanocatalyst for efficient hydrogen evolution reaction in wide pH range. Appl Catal B Environ. 192:126–133.

Hoffert MI, Caldeira K, Jain AK, Haites EF, Harvey LDD, Potter SD, Schlesinger ME, Schneider SH, Watts RG, Wigley TML, Wuebbles DJ. 1998. Energy implications of future stabilization of atmospheric CO2

content. Nature. 395:881–884.
Huang N, Yang L, Zhang M, Yan S, Ding Y, Sun P, Sun X. 2019. Cobalt-Embedded N-Doped Carbon Arrays Derived In Situ as Trifunctional Catalyst Toward Hydrogen and Oxygen Evolution, and Oxygen Reduction. ChemElectroChem. 6:4522–4532.
Jayaseelan SS, Bhuvanendran N, Xu Q, Su H. 2020. Co3O4 nanoparticles decorated Polypyrrole/carbon nanocomposite as efficient bi-functional electrocatalyst for electrochemical water splitting. Int J Hydrogen Energy. 45:4587–4595.
Ju Y-W, Jung H-R, Lee W-J. 2007. Electrochemical characteristics of poly(3-methyl thiophene)/sulfonated-SEBS composite electrode for polymer battery. Synth Met. 157:823–826.
Kap Z, Ülker E, Nune SVK, Karadas F. 2018. Electrocatalytic hydrogen evolution with cobalt–poly(4-vinylpyridine) metallopolymers. J Appl Electrochem. 48:201–209.
Kavanoz M, Ülker E, Bük U. 2015. A Novel Polyaniline–Poly(3-Methylthiophene)–Poly(3,3′-Diaminobenzidine) Electrode for the Determination of Dopamine in Human Serum. Anal Lett. 48:75–88.
Lewis NS, Nocera DG. 2006. Powering the planet: chemical challenges in solar energy utilization. PNAS. 103:15729–15735.
Masa J, Weide P, Peeters D, Sinev I, Xia W, Sun Z, Somsen C, Muhler M, Schuhmann W. 2016. Amorphous Cobalt Boride (Co2B) as a Highly Efficient Nonprecious Catalyst for Electrochemical Water Splitting: Oxygen and Hydrogen Evolution (Adv. Energy Mater, 2016, 6, 1502313, 10.1002/aenm.201502313). Adv Energy Mater. 6:1502313.
Merki D, Fierro S, Vrubel H, Hu X. 2011. Amorphous molybdenum sulfide films as catalysts for electrochemical hydrogen production in water. Chem Sci. 2:1262.
Merki D, Vrubel H, Rovelli L, Fierro S, Hu X. 2012. Fe, Co, and Ni ions promote the catalytic activity of amorphous molybdenum sulfide films for hydrogen evolution. Chem Sci. 3:2515–2525.
Nune SVK, Basaran AT, Ülker E, Mishra R, Karadas F. 2017. Metal Dicyanamides as Efficient and Robust Water-Oxidation Catalysts. ChemCatChem. 9:300–307.
Pan Y, Liu Y, Liu C. 2015. Phase- and morphology-controlled synthesis of cobalt sulfide nanocrystals and comparison of their catalytic activities for hydrogen evolution. Appl Surf Sci. 357:1133–1140.
Patel PP, Velikokhatnyi OI, Ghadge SD, Hanumantha PJ, Datta MK, Kuruba R, Gattu B, Shanthi PM, Kumta PN. 2018. Electrochemically active and robust cobalt doped copper phosphosulfide electro-catalysts for hydrogen evolution reaction in electrolytic and photoelectrochemical water splitting. Int J Hydrogen Energy. 43:7855–7871.
Schlapbach L, Züttel A. 2001. Hydrogen-storage materials for mobile applications. Nature. 414:353–358.
Sivaraman P, Thakur AP, Shashidhara K. 2020. Poly(3-methyl thiophene)-graphene nanocomposites for asymmetric supercapacitors. Synth Met. 259:116255.
Sun Y, Liu C, Grauer DC, Yano J, Long JR, Yang P, Chang CJ. 2013. Electrodeposited cobalt-sulfide catalyst for electrochemical and photoelectrochemical hydrogen generation from water. J Am Chem Soc. 135:17699–17702.
Tourillon G, Garnier F. 1984. Inclusion of Metallic Aggregates in Organic Conducting Polymers. A New Catalytic System, [ Poly(3-methylthiophene)-Ag-Pt], for Proton Electrochemical Reduction. J Phys Chem. 3:405–407.
Wang H-S, Li T-H, Jia W-L, Xu H-Y. 2006. Highly selective and sensitive determination of dopamine using a Nafion/carbon nanotubes coated poly(3-methylthiophene) modified electrode. Biosens Bioelectron. 22:664–669.
Wang H, Lee H-W, Deng Y, Lu Z, Hsu P-C, Liu Y, Lin D, Cui Y. 2015. Bifunctional non-noble metal oxide nanoparticle electrocatalysts through lithium-induced conversion for overall water splitting. Nat Commun. 6:7261.

# Mikroplastiklerin doğadaki varlığı ve olası riskleri

Gülcan Çınar*, Muhittin Doğan

Gaziantep Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Şehitkamil-Gaziantep

*Sorumlu yazar e-mail: gulcancnar03@gmail.com

## Özet

Plastik atıklar, karasal ve sucul habitatlarda birikebilmektedir. Bu atıklar giderek daha küçük parçalara bölünürler. Plastik atıklar tüm şekil ve boyutlarda olabilir, ancak uzunluğu beş milimetreden kısa olanlar "mikro plastik" olarak adlandırılır. Plastik atıklar, çevresel açıdan kalıcı ve var olan endişeleri arttıran karmaşık bir kirleticidir. Toplumsal kullanım için yıllık milyonlarca ton plastiğin üretilmesinden dolayı çevreye salınan mikroplastik malzemelerin kaynağını, miktarını ve bileşimini anlamak çok zordur. Bugüne kadarki mikroplastik araştırmaların çoğu sucul ortamlara odaklanmıştır. Mikro plastiklerin karasal ortamlarda, özellikle tarımsal ya da kentsel alanlar gibi yüksek antropojenik etkisi olan bölgelerde birikmesi muhtemeldir. Fiziksel ve kimyasal özelliklerinden ötürü, bu yaygın kirletici maddelerin tüm dünyada bulunduğu ve çevreye dağıldığı belirlenmiştir. Ayrıca çok sayıda organizmanın bünyesine katıldığı kanıtlanmıştır. Her ne kadar biyokimyasal olarak inert kabul edilse de, bu malzemeler kalıcı organik kirleticiler gibi diğer kimyasal maddeleri adsorbe edebilir, dolayısıyla potansiyel olarak biyobirikim ve biyomagnifikasyon fenomenlerine yol açabilirler. Bu çalışmada, mikroplastiklerin doğadaki varlığı ve olası riskleri hakkında bilgilerin verilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Mikroplastik, çevre kirliliği, biyobirikim, olası riskler

## Presence and possible risks of microplastics in nature

## Abstract

Plastic wastes can accumulate in terrestrial and aquatic habitats. These wastes are increasingly divided into smaller pieces. Plastic waste can come in all shapes and sizes, but those shorter than five millimeters in length are called "micro plastics". Plastic waste is a complex pollutant that is environmentally permanent and increases existing concerns. It is very difficult to understand the source, quantity and composition of microplastic materials released into the environment due to the production of millions of tons of plastic for annual use. Most microplastic research to date has focused on aquatic environments. Micro plastics are likely to accumulate in terrestrial environments, especially in areas with high anthropogenic impact, such as agricultural or urban areas. Due to their physical and chemical properties, it has been determined that these common pollutants are found all over the world and distributed to the environment. In addition, it has been proven that a large number of organisms have joined the body. Although considered biochemical inert, these materials can adsorb other chemicals such as persistent organic pollutants, thus potentially leading to bioaccumulation and biomagnification phenomena. In this study, it is aimed to give information about the existence and possible risks of microplastics in nature.

**Keywords:** Microplastic, environmental pollution, bioaccumulation, possible risks

## GİRİŞ

Çevresel bir kirletici olan mikroplastikler üzerine yapılan araştırmalar hızla ilerlemektedir. Denizel mikroplastik araştırmaları ön planda olmasına rağmen, son yıllarda tatlı su ortamlarındaki mikroplastikler üzerinde yapılan çalışmaların eksikliğini fark eden araştırmacılar bu alanı öncelikli olarak ele almaya başlamışlardır. Göl ve nehir sistemlerindeki mikroplastikleri ölçmek ve canlıların mikroplastiklere maruz kalmasını ve mikroplastiklerin organizmalar tarafından alınımı değerlendirmek üzere çalışmalar başlamıştır (Dris vd., 2015; Wagner vd., 2014)

Plastik kalıntılar, geri dönüşümü sınırlı ve kalıcı olmaları nedeniyle doğal ortamda hızlı bir şekilde artarak birikmektedir (Rillig, 2012). Yıllık plastik üretimi 2004 yılından 2014 yılına kadar geçen sürede yaklaşık 84 milyon ton artışla 311 milyon tonu aşmıştır (PlasticsEurope, 2015; Thompson vd., 2005). 2050 yılına kadar

bunun muazzam bir artışla 33 milyar tona çıkabileceği tahmin edilmektedir (Rochman vd., 2013a). Bu durumda çevreye salınan antropojenik atık maddelerin, % 54'e varan bir miktarını plastiklerin oluşturabileceği tahmin edilmektedir (Hoellein vd., 2014).

Plastiklerin yaygın kullanımı ambalaj malzemeleri (toplam % 39,5 plastik üretimi), inşaat malzemeleri (% 20,1), otomotiv bileşenleri (% 8,6), elektronik cihazlar (% 5,7) ve tarım malzemeleri (% 3,4), geri kalanı ise ev aletleri ve spor ekipmanları gibi ürünleri içermektedir (Plastics Europe, 2015). Avrupa Birliği'nde kullanılmak üzere kayıtlı yaklaşık 30.000 farklı Polimer materyali vardır. Bir Polimer'i tanımlamak zordur, çünkü tanımlar ticari olarak gizli olan birçok bilgi açısından üreticiler arasında farklılık göstermektedir. Ancak Avrupa Komisyonu raporu, bu 30.000 farklı Polimer'in % 84'ünün termoplastiklerle temsil edildiğini belirtmektedir (Postle vd., 2012). Benzer özellikleri paylaşsalar da, her polimer plastisite ve yoğunlukları bakımından farklı fiziksel özelliklere sahiptir. Özellikle malzemenin yoğunluğu çevresel kaderin belirlenmesinde önemli olacaktır. Örneğin, yoğunluk, parçacıkların su yüzeylerinde yüzüp yüzmemeleri veya tortuya yerleşmeleri ve karada rüzgar hareketi ile taşınmaları kolaylığı gibi durumlarda dahil olmak üzere su ortamında partiküllerin nasıl olacağını etkiler (Zylstra, 2013). Bununla birlikte, özellikleri bilinse bile, polimerlerin kaderini tahmin etmek zor olabilir. Örneğin, polietilen ve polipropilen gibi yüzer parçacıkların tortular içinde tutulabildiği gözlenmiştir (Horton vd, 2016). Ortamdaki plastik parçacıkların bozulmaya devam edeceği ve giderek küçüleceği ve sonunda 'mikroplastikler'i oluşturacağı anlaşılmıştır (Koelmans vd., 2015; Mattsson vd., 2015).

Plastik atıklar büyük ölçüde boyuta göre sınıflandırılır: mega döküntüler (>100 mm), makro döküntüler (>20 mm), mezo döküntüler (>20–5 mm) ve mikro döküntüler (<5 mm) (Barnes vd., 2009). Mikro ölçekli plastik parçacıklar ilk olarak 1970'lerin başlarında deniz ortamında gözlenmiştir (Buchanan, 1971; Carpenter ve Smith, 1972), 2004 yılında Thompson vd. tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçlanmasına kadar "mikroplastik" terimi yaygın olarak kullanılmamıştır (Thompson vd., 2004). Mikroplastikler daha düşük bir boyut sınırı tanımlanmamış olmasına rağmen artık yaygın olarak en büyük boyutu 5 mm'den küçük partiküller olarak tanımlanmaktadır (Arthur ve Baker, 2009; Duis ve Coors, 2016; Faure vd., 2012).

Mikroplastikler, birincil ve ikincil mikroplastikler şeklinde iki kategoriye ayrılır. Birincil mikroplastikler başlıca, kumlama için endüstriyel aşındırıcılarda, akrilikte veya polyester boncuklarda kullanılır (von Moos vd., 2012; Zitko ve Hanlon, 1991). Plastik ön üretim peletleri veya kişisel bakımda kullanılan polietilen 'mikro boncuklar' içeren ürünler ve temizleyicilerdeki peeling ajanları olarak kullanılan birincil mikroplastikler mikrometre boyut aralığında özel olarak üretilir (Napper vd., 2015). Kişisel bakım ürünlerinden elde edilen birincil mikro boncukların da mikroplastik kirliliğine neden olduğu bilinen bir gerçektir (Castañeda ve diğerleri, 2014; Murphy vd., 2016; Napper vd., 2015).

İkincil mikroplastikler ise, daha büyük plastik nesnelerin (mezo ve makroplastik) bir su kütlesine veya karasal ortama girmesiyle, mekanik, fotooksidatif ve / veya biyolojik bozulmaya uğradığında meydana gelir (Thompson vd., 2004, Browne ve diğerleri 2008; Cooper ve Corcoran, 2010; Andrady, 2011).
Bir diğer ikincil mikroplastik kaynağı tarımsal plastiklerin kullanımı ve parçalanmasıdır. Örneğin, sıcaklık ve nemi kontrol etmek amacıyla; tarımsal ve bahçecilik uygulamalarında yabancı ot büyümesini geciktirmek için plastik malçlar ve polituneller, ayrıca çimlenmeyi kontrol etmek için de polimer tohum kaplamaları (Clayton vd., 2004) kullanılır (Kasirajan ve Ngouajio, 2012; Steinmetz vd., 2016). Tohum kaplamaları için yaygın olarak kullanılan polimerler biyolojik olarak parçalanamaz ve bu nedenle çimlenmeyi takiben toprakta kalacaklardır (Schultz vd., 2014; Turnblad ve Chen, 1998).

İnsan faaliyetlerinin bir sonucu olarak mikroplastiklerin karasal ortamlarda da yaygın olduğu bilinmesine rağmen, karasal ortamlarda mikroplastiklerin miktarını belirleme çalışmalarında bir eksiklik vardır. Aslında, yapılan çalışmalar sonucunda mikroplastiklerin çevredeki varlığı hakkında elde edilen mevcut bilgilerin çoğu, sadece karasal ve tatlı su ortamlarındaki mikroplastiklerin kaynakları ve okyanuslara ulaşım yolları üzerine odaklanılmış olunduğunu göstermektedir. Ancak, tüm plastiklerin büyük çoğunluğunun karada kullanılacağı ve karaya atılacağı dikkate alındığında, karasal ortam ve tatlı su ortamları, hem nokta kaynağı hem de yaygın kaynaklardan büyük miktarlarda antropojenik çöp alacak, bu nedenle de her boyuttaki plastikler ile yoğun kirliliğe maruz kalacaktır. Bundan dolayı, toprakların mikroplastik döküntüler için uzun süreli bir biriktirici ve taşıyıcı olarak hareket etmesi muhtemeldir (Rillig, 2012; Zubris ve Richards, 2005)

Bu nedenle, mikroplastiklerin ekosistemlere getirdiği tehlike ve risklerin değerlendirilmesi için karasal sistemlere giren ve tatlı su sistemlerine taşınan mikroplastiklerin oranlarını, taşınmasını ve kaderini anlamak oldukça önemlidir. Bu derlemenin amacı, tatlı su ortamları ve topraklardaki mikroplastiklerin davranışı, kaderi ve ekolojik etkilerini anlamakla için mevcut literatür bilgilerini sentezlemektir.

**Mikroplastiklerin kaynakları, çevresel varlığı ve taşınması**

Mikroplastiklerin genel olarak doğal çevrede birikmesi, tutulması ve taşınması, antropojenik faaliyetlere, çöplerin geri dönüştürülmesine; mikroplastiklerin yoğunluk, şekil ve boyut gibi parçacık özelliklerine; rüzgar, yağış, sel gibi çevresel etkiler ve topoğrafik özelliklere bağlı olarak belirlenebilmektedir (Zylstra, 2013). Birincil mikroplastiklerin karasal ortamlara önemli bir şekilde doğrudan girdisinin, kişisel bakım veya ev ürünlerinden toprağa sentetik lifler veya tortulanmış mikroplastikler içeren kanalizasyon çamuru uygulanması yoluyla olduğu tespit edilmiştir (Habib vd., 1996; Zubris ve Richards, 2005).

Sentetik tekstilde kullanılan polimerler arasında polyester ve naylon bulunurken, polietilen veya polipropilen genellikle kozmetikte mikro boncuk veya parıltı verici olarak kullanılır. Kanalizasyon arıtma çalışmaları mikroplastik parçacıkların çoğunun giderilmesinde etkili olduğundan atık sudan uzaklaştırılan partiküllerin çoğu çamur içinde tutulacaktır (Magnusson ve Norén, 2014; Mintenig vd., 2017). Zubris ve Richards (2005). Bilinen bir kanalizasyon çamuru uygulaması geçmişine sahip toprakların, kanalizasyon çamuru almayan topraklara göre önemli ölçüde daha yüksek bir oranda sentetik mikrofiber konsantrasyonları içerdiğini bulmuştur. Bazı alanlarda, son çamur uygulamasından 15 yıl sonra sentetik mikrofiberler bulunduğunu tespit etmişledir (Zubris ve Richards, 2005).

Mikroplastiklerin toprak sistemlerine nasıl girebildikleri ayrıca bu durumun sınırı ve kapsamı henüz tam olarak araştırılmamış veya anlaşılmamıştır. Ancak tarım arazilerine uygulanan endüstriyel olarak işlenmiş kompost yoluyla toprağa verilebilecekleri kabul edilmiştir (Sullivan, 2011). Avrupa'da, kanalizasyon çamurunu tarımsal gübre olarak kullanmak için kompostlamak ve pastörize etmek ve aynı zamanda atıksu arıtımı yoluyla üretilen büyük miktarlarda çamuru toprağa atmak yaygın bir uygulamadır (DEFRA, 2012). Avrupa Birliği'nde her yıl dört ila 5 milyon ton arasında kuru atıksu çamuru ekilebilir araziye uygulanmaktadır (Cieœlik vd., 2015; Willén vd., 2016), ancak uygulama oranları ülkeler arasında oldukça değişkendir (Nizzetto vd., 2016b). Toprağa uygulanan çamur içindeki zararlı maddeler hakkındaki düzenlemelere rağmen, mikroplastikler bu düzenlemeler içersinde henüz dikkate alınmamıştır. Dolayısıyla karalarda bulunan mikroplastiklerin kütlesi 400.000 tonu aşabilir ve bu miktar şu anda dünyadaki okyanusların yüzey sularında mevcut olduğu tahmin edilen kütlenin üzerinde olduğu düşünülmektedir (Nizzetto vd., 2016b).

Kuzeydoğu Atlantik'ten arşivlenmiş plankton örnekleri üzerinde yapılan bir araştırma, mikroskobik plastiklerin bolluğunun son 40 yılda önemli ölçüde arttığını ve bu eğilimin plastik üretimindeki küresel artışı yansıttığını göstermiştir. Benzer parçacıklar Birleşik Krallık' taki kumsallarda da bulunmuş ve bu nedenle mikroplastik parçacıklar bir dizi habitatta biriken yaygın bir kirletici gibi görünmeye başlanmıştır (Thompson vd., 2004).

Tatlı su ortamlarında yapılan mikroplastik çalışmaları hızla ilerlemektedir ve dünyadaki göller ve nehirler de dahil olmak üzere çeşitli tatlı su ortamlarında mikroplastik parçacıklar bulunmaktadır. Su yüzeyi, derinlik, rüzgar, akımlar ve parçacıkların yoğunluğu, bu su sistemleri içersindeki parçacıkların taşınmasını ve kaderini belirleyen faktörlerdir (Eriksen vd., 2014, 2013; Fischer vd., 2016). Bazı kanalizasyon arıtma özelliklerine rağmen,% 99,9'a kadar mikroplastik parçacıkları temizlenen atık sudan tatlı su ortamına salınabilir (Carr vd., 2016; Murphy vd., 2016). Tatlı su kütleleri için, kanalizasyon arıtımından çıkan atık suyun önemli bir mikroplastik kaynağı olduğu düşünülmektedir. Sentetik mikrofiberler, birçok çalışma ile tatlı su, kara ve deniz ortamlarında bulunan en bol mikroplastik parçacık türü olarak tanımlanmıştır (Browne vd., 2011; Dubaish ve Liebezeit, 2013; Free vd., 2014).

Nehir sistemlerinde plastik parçacıkların taşınması, hidrolojik özellikler ve çevresel koşullar gibi tortu taşınmasını etkileyen faktörlerden büyük ölçüde etkileneceği düşünülmektedir (Nizzetto vd., 2016a). Düşük debi ve nehir derinliği veya akış hızındaki değişiklik gibi koşullar partikül maddenin birikmesine neden olabilir. Ancak yüksek hızda meydana gelen seller ve erozyon, partiküllerin akış yoluyla taşınmasına ve daha

önce çökeltilmiş partiküllerin mobilizasyonuna yol açabilir (Milliman vd., 1985). Sucul ortamdaki plastikler, dalga hareketi ve tortu parçacıklarının aşındırma etlisiyle birlikte parçalanır. Ayrıca, bazı plastikler bakteri ve mantarlar tarafından biyolojik olarak parçalanmaya karşı hassastır (Gregory ve Andrady 2003).

Bilindiği kadarıyla, bugüne kadar karasal alanlardaki mikroplastik varlığını ölçen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, yapılan çalışmalardaki kanıtlara dayanarak, mikroplastiklerin karasal ortamlarda bulunma olasılığı yüksektir ve ayrıntılı olarak araştırılırsa, tatlı su ve deniz ortamlarında da eşit derecede yaygın olduğu bulunabilir (Nizzetto vd., 2016a).

Topraktaki mikroplastiklerin doğrudan, kantitatif kanıtı sınırlıdır ve bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu toprakta sentetik liflerin varlığını bildirmiştir. Ancak mikroplastiklerin doğal kaynaklarını bulamamışlar veya parçacıkların miktarını veya boyutunu ölçememişlerdir. Toprak ve okyanuslar arasında birçok farklı özellik ve süreç olmasına rağmen, birçok biyota, özellikle mikroorganizma, esasen suculdur ve toprak parçacıklarına bağlanan ince bir su filminde gelişir. Bu nedenle, hem karasal hem de sucul ortamlarda bazı benzer ilkeler geçerlidir. Deniz ve tatlı su ortamlarındaki araştırmalar, plankton ve çift kabuklular gibi süzerek beslenenlerin mikroplastik parçacıklarını aldığını doğrulamıştır (Browne vd., 2008). Teorik olarak, mikroplastikler, toprakta yaşayan zararlıların gıda ağında potansiyel olarak biriken kompostta birikebilir; akarlar, kollembola veya enktraidler gibi toprak mikro ve mezofaunatik eklembacaklıları tarafından alınabilir. Ek bir endişe olarak, kompost değiştirilmiş topraktaki mikroplastik parçacıkların zararlı kirletici maddeleri emmesi ve toprağın fiziksel özelliklerini değiştirerek, toprakta birikip konsantre hale gelme potansiyelleri mevcuttur. Bununla birlikte, kompost değiştirilmiş toprak sistemlerindeki mikroplastiklerin miktarını, boyutunu, kalıcılığını, birikip birikmeyeceğini ve potansiyel olarak topraktaki işlevselliğini ve karasal ekosistem sağlığını olumsuz etkileyebilecek seviyelere ulaşıp ulaşmayacağını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. (Rillig, 2012).

**Mikroplastiklerin ekolojik etkileri**

Plastiklerin yaygın olarak bulunduğuna dair kanıtlara dayanarak, karasal ve tatlı su ekosistemlerindeki organizmaların mikroplastik parçacıklarla karşılaşması muhtemeldir. Partikül büyüklüğüne ve organizmanın fizyolojik ve davranışsal özelliklerine bağlı olarak, bu partiküllerin omurgasızlar ve omurgalılar tarafından yutulmasını uygun hale gelir. Aslında bu tür tüketim birçok deniz türünde yaygın olarak gözlemlenmiştir. Plastik, yutulduktan sonra büyük ölçüde atılsa da, mikroplastiklerin yutulan diğer maddelere oranla bağırsakta daha fazla tutulabileceğini gösteren kanıtlar vardır (Browne vd., 2008). Ayrıca, parçacıkların bağırsak duvarını bile geçebileceğine ve diğer vücut dokularına taşınabileceğine ve bilinmeyen sonuçlara neden olabileceğine dair kanıtlar vardır ( Farrell ve Nelson, 2013; von Moos vd., 2012).

Bugüne kadar yapılan araştırmalar, ağırlıklı olarak denizde yaşayan türler üzerinedir. Birçok organizasyon düzeyinde, detritivorlar, süzerek beslenenler ve yırtıcılar dahil olmak üzere farklı beslenme tiplerine sahip çok çeşitli türlerde mikroplastik parçacıkların alındığını gösterilmiştir. Daha düşük trofik seviyelerde bulunan organizmalarda partikül birikimine ek olarak (Browne vd., 2008), deniz türlerinde, özellikle de çift kabuklular ve kabuklular arasında mikroplastik partiküllerin trofik transferi için kanıtlar da vardır (Farrell ve Nelson, 2013; Van Cauwenberghe ve Janssen, 2014; Watts vd., 2014).

Plastik malzemeler genellikle esneklik, sertlik, UV stabilitesi, alev geciktirici ve renklendirmeler gibi belirli fiziksel özellikler vermek için çok çeşitli plastikleştirici kimyasalları içerir (Lithner vd., 2009; Moore, 2008; Teuten vd., 2009). Plastiklerle ilişkili kimyasalların çoğu, bisfenol-A, di-n-butil ftalat ve di-ftalat gibi ftalatlar, polibromlu difenil eterler (PBDE'ler) ve renklendirici olarak kullanılan metaller dahil olmak üzere toksik veya endokrin yıkıcılar olarak tanımlanmıştır (Hua vd., 2005; Kim vd., 2006; 2009; Oehlmann vd., 2009). Bunlar gibi ilave kimyasallar polimer molekülüne zayıf bağlanır veya hiç bağlanmaz ve bu nedenle bu kimyasallar zamanla plastikten sızar. Bu salımlar, partikül dağılımının sınırlı olduğu ve plastiklerin UV bozunması ve yüksek sıcaklıklar yaşayacağı ortamlarda kolaylaştırılabilir (Andrady, 2011).

Mikroplastiklerin, çevre içinde organoklorin pestisitler, PAH'lar, PCB'ler, PBDE'ler, dioksinler ve metaller gibi bir dizi farklı hidrofobik organik kimyasallara bağlandığı yapılan araştırmalr sonucunda anlaşılmıştır (Besseling vd., 2013; Mato vd., 2001; Rochman vd., 2013c).

Bunu takiben, mikroplastikler okyanuslar, denizler, göller ve nehirler gibi büyük su kütlelerinin çoğunda bulunmuştur. Bu nedenle yapılan araştırmalar sucul çevreye odaklanarak mikroplastiklerin ekotoksikolojik etkilerine yönelmiştir. Sentetik polimer endüstrisi, etilen, stiren ve vinil klorür gibi çoğu petrokimyasal monomerin ana uç noktasını temsil eder. Termoplastikler, ürün ambalajı ve plastik poşetlerin, özellikle polietilenin üretiminde kullanılan en yaygın polimerlerdir. En çok kullanılan iki polietilen derecesi düşük yoğunluklu polietilen (DYPE) ve yüksek yoğunluklu polietilendir (YYPE). DYPE esnek ve şeffaf olduğu için, taşıyıcı torba, film ve plastik tabakaları üretmek için en yaygın olarak kullanılan termoplastiktir (Andrady, 2003). Polietilen bazlı malzemelerin mikroplar tarafından bozunmaya karşı direnci iyi bilinmektedir. Karlsson ve Albertsson (1998), radyoaktif işaretli düşük yoğunluklu polietileni (DYPE) gübre olarak toprağa vermiş ve 10 yıl boyunca $^{14}$C-karbon diokside mineralizasyonunu izlemiş ve DYPE' nin % 10'undan daha azının mineralize olduğunu bildirilmiştir (Palmisano ve Pettigrew, 1992).

## SONUÇ

Hem birincil hem de ikincil mikroplastikler çevreye girmeye ve daha küçük parçacıklara bölünmeye devam edecektir.

Bu durum daha küçük fragmentlerin oluşmasına, organizmalar tarafından daha fazla alım olasılığına, kimyasallarla etkileşimler için artan yüzey alanına sebep olacaktır. Ayrıca kütle birimi başına daha fazla sayıda partikül nedeniyle organizma sağlığı için daha büyük bir risk oluşturması muhtemeldir hele gelecektir (Jeong vd., 2016; Lee vd., 2013).

Bu derlemedeki bilgilere dayanarak, mikroplastiklerle ilgili birçok sorunun halen tam anlamıyla cevaplanamadığı görülmektedir. Bu sorulardan bazıları şunlardır:

1) Karasal ortamlardaki mevcut mikroplastik kirliliğin kapsamı nedir ve bu durum su ortamlarındaki bilinen kirlenme ile nasıl karşılaştırılır? Hangi polimerler en fazla bulunur ve bu habitatlara ve bölgelere göre değişir mi?

2) Farklı plastik malzemelerin çevresel koşulları ve özellikleri, tatlı su ve karasal ortamlarda bulunan koşullar altında mikroplastik davranışını ve biyoyararlanımı ne ölçüde etkiler?

3) Olumsuz etkiler esas olarak parçacığın fiziksel etkileri, kimyasal toksisite veya karışım etkilerinden mi kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu durum polimerler ve türler arasında farklılık gösterir mi?

4) mikroplastiklere maruz kalma koşulları altında olası ekolojik etkiler nelerdir?

Bu sorular göz önünde bulundurulduğunda daha fazla ve daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu gerçeği açıkça anlaşılmaktadır.

## KAYNAKLAR

Andrady, A. L. (Ed.). 2003. Plastics and the Environment. New York, NYJohn Wiley and Sons.

Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 62: 1596-1605.

Arthur, C., Baker, J., 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurance, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration (Technical Memorandum NOSOR And R-30).

Barnes, D.K., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philosophical Transactions of the Royal Society, B 364: 1985–1998.

Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2013. Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). Environmental Science and Technology, 47: 593–600.

Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., Thompson, R. C. 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). Environmental Science and Technology, *42*(13): 5026-5031.

Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R., 2011. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. Environmental Science Technology, 45: 9175–9179.

Buchanan, J., 1971. Pollution by synthetic fibres. Mar. Pollut. Bull. 2, 23. Carpenter, E.J., Smith, K., 1972. Plastics on the Sargasso Sea surface. Science, 175: 1240–1241.

Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A.G., 2016. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. . Water Resistant, 91: 174–182.

Castañeda, R.A., Avlijas, S., Simard, M.A., Ricciardi, A., Smith, R., 2014. Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments. Can. J. Fish. Aquatic Science, 71: 1767–1771.

Cieślik, B.M., Namieśnik, J., Konieczka, P., 2015. Review of sewage sludge management: standards, regulations and analytical methods. J. Cleaner Production, 90: 1–15.

Clayton, G.W., Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Blackshaw, R.E., Dosdall, L., Stevenson, F.C., Johnson, E.N., Ferguson, T., 2004. Polymer seed coating of early- and late-fall-seeded herbicide-tolerant canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Can. J. Plant Science, 84: 971–979.

Cooper, D. A., Corcoran, P. L. 2010. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. Marine Pollution Bulletin, 60(5): 650-654.

DEFRA, 2012.WasteWater Treatment in the United Kingdom – 2012, Implementation of the European Union Urban Waste Water Treatment Directive – 91/271/EEC. Department for Environment, Food and Rural Affairs, London.

Dris, R., Imhof, H., Sanchez, W., Gasperi, J., Galgani, F., Tassin, B., Laforsch, C., 2015. Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles. *Environmental Chemistry*, 12: 539–550.

Dubaish, F., Liebezeit, G., 2013. Suspended microplastics and black carbon particles in the jade system, Southern North Sea. Water Air Soil Pollution, 224.

Duis, K., Coors, A., 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental science* Europe, 28: 2.

Eriksen,M., Lebreton, L.C., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., Reisser, J., 2014. Plastic pollution in the world's oceans: More than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. PLoS One 9, e111913.

Farrell, P., Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). Environmental Pollution, 177: 1–3.

Faure, F., Corbaz, M., Baecher, H., de Alencastro, L., 2012. Pollution due to plastics and microplastics in Lake Geneva and in the Mediterranean Sea. *Archives* of *Science*, 65: 157–164.

Fischer, E.K., Paglialonga, L., Czech, E., Tamminga,M., 2016. Microplastic pollution in lakes and lake shoreline sediments - a case study on Lake Bolsena and Lake Chiusi (central Italy). Environmental Pollution, 213: 648–657.

Free, C.M., Jensen, O.P., Mason, S.A., Eriksen, M., Williamson, N.J., Boldgiv, B., 2014. Highlevels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. Marine Pollution Bulltein, 85: 156–163.

Gregory MR, Andrady AL. 2003. Plastic in the marine environment. In: Andrady AL, editor. Plastics and the environment. New York (NY): John Wiley, P: 379– 401.

Habib, D., Locke, D.C., Cannone, L.J., 1996. Synthetic fibers as indicators of municipal sewage sludge, sludge products, and sewage treatment plant effluents. Water Air Soil Pollution, 103: 1–8.

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology*, 46: 3060–3075.

Hoellein, T., Rojas, M., Pink, A., Gasior, J., Kelly, J., 2014. Anthropogenic litter in urban freshwater ecosystems: distribution and microbial interactions. PLoS One 9, e98485.

Horton, A.A., Svendsen, C., Williams, R.J., Spurgeon, D.J., Lahive, E., 2017. Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK - Abundance, sources and methods for effective quantification. Marine *Pollution* Bulletin, 114: 218–226.

Hua, X.Y., Wen, B., Zhang, S., Shan, X.Q., 2005. Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils. Ecotoxicology Environmental Safety, 62: 26–34.

Imhof, H.K., Laforsch, C., Wiesheu, A.C., Schmid, J., Anger, P.M., Niessner, R., Ivleva, N.P., 2016. Pigments and plastic in limnetic ecosystems: a qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes. Water Resistant, 98: 64–74.

Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. Environmental Pollution, 185: 352–364.

Jeong, C.B., Won, E.J., Kang, H.M., Lee, M.C., Hwang, D.S., Hwang, U.K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, S.J., Lee, J.S., 2016. Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the Monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). Environmental Science and Technology, 50: 8849–8857.

Karlsson, S., Albertsson, A. C. 1998. Biodegradable polymers and environmental interaction. Polymer Engineering and Science, 38(8): 1251-1253.

Kasirajan, S., Ngouajio,M., 2012. Polyethylene and biodegradablemulches for agricultural applications: a review. Agronomy for Sustainable Development, 32: 501–529.

Kim, D.J., Lee, D.I., Keller, J., 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. Bioresource Technology, 97: 459–468.

Klein, S., Worch, E., Knepper, T.P., 2015. Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the rhine-main area in Germany. Environmental Science and Technology, 49: 6070–6076.

Koelmans, A.A., Besseling, E., Shim, W.J., 2015. Nanoplastics in the aquatic environment. *Critical* Reviews, 325–340.

Lee, K.W., Shim, W.J., Kwon, O.Y., Kang, J.H., 2013. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. Environmental Science and Technology, 47: 11278–11283.

Liebezeit, G., Liebezeit, E., 2013. Non-pollen particulates in honey and sugar. F Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment. Foreword 30 (12): 2136-2140

Lithner, D., Damberg, J., Dave, G., Larsson, K., 2009. Leachates fromplastic consumer products - screening for toxicity with *Daphnia magna*. Chemosphere, 74: 1195–1200.

Magnusson, K., Norén, F., 2014. Screening of Microplastic Particles in and Downstream a Wastewater Treatment Plant. C 55. IVL Swedish Environmental Research Institute.

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T., 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. Environmental Science and Technology, 35: 318–324.

Mattsson, K., Hansson, L.A., Cedervall, T., 2015. Nano-plastics in the aquatic environment. Evnvironment Science Process. Impacts 17, 1712–1721.

Milliman, J.D., Huang-Ting, S., Zuo-Sheng, Y., Mead, R.H., 1985. Transport and deposition of river sediment in the Changjiang estuary and adjacent continental shelf. *Continental Shelf* Research, 4: 37–45.

Mintenig, S.M., Int-Veen, I., Loder, M.G., Primpke, S., Gerdts, G., 2017. Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane arraybased micro-Fourier-transform infrared imaging. Water Resistant, 108: 365–372.

Moore, C.J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. Environmental Research, 108: 131–139.

Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., Quinn, B., 2016. Wastewater treatment Works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment.. *Environmental Science* and *Technology*, 50: 5800–5808.

Naden, P.S., Murphy, J.F., Old, G.H., Newman, J., Scarlett, P., Harman, M., Duerdoth, C.P., Hawczak, A., Pretty, J.L., Arnold, A., Laizé, C., Hornby, D.D., Collins, A.L., Sear, D.A., Jones, J.I., 2016. Understanding the controls on deposited fine sediment in the streams of agricultural catchments. Science Total Environment, 547: 366–381.

Napper, I.E., Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2015. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. Marine Pollution Bulltein, 99: 178–185.

Nizzetto, L., Bussi, G., Futter, M.N., Butterfield, D.,Whitehead, P.G., 2016a. A theoretical assessment of microplastic transport in river catchments and their retention by soils and river sediments. Evnvironmental Science: Processes and Impacts, 18: 1050–1059.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. Philosophical Transactions of the Royal Society ***B***: Biological Sciences, 364: 2047–2062.

Palmisano, A. C., Pettigrew, C. A. 1992. Biodegradability of plastics. Bioscience, 42(9): 680-685.

PlasticsEurope, 2015. Plastics - the Facts 2015. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. Plastics Europe, Association of Plastic Manufacturers, Brussels.

Postle, M., Holmes, P., Camboni,M., Footitt, A., Tuffnell, N., Blainey,M., Stevens, G., Pye, A., 2012. Review of REACH With Regard to the Registration Requirements on Polymers. European Commission, DG Environment.

Rillig, M. C. 2012. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil. Environmental Science and Technology, 46(12): 6453-6454.

Rochman, C.M., Browne, M.A., Halpern, B.S., Hentschel, B.T., Hoh, E., Karapanagioti, H.K., Rios-Mendoza, L.M., Takada, H., Teh, S., Thompson, R.C., 2013a. Policy: classify plastic waste as hazardous. Nature, 494: 169–171.

Rochman, C.M., Manzano, C., Hentschel, B.T., Simonich, S.L., Hoh, E., 2013c. Polystyrene plastic: a source and sink for polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. Environmental Science and Technology, 47: 13976–13984.

Schultz, T.M., Finnel, A.H., Collins, G.L., 2014. Seed Coating Hydrogels, US 2014/0100111 A1 (Google Patents).

Steinmetz, Z., Wollmann, C., Schaefer, M., Buchmann, C., David, J., Troger, J., Munoz, K., Fror, O., Schaumann, G.E., 2016. Plastic mulching in agriculture. Trading short-term agronomic benefits for long-term soil degradation? Science of the Total Environment, 550: 690–705.

Sullivan, D. 2011. Compostable Plastics and Organic Farming. Emmaus, Country/State: JG Press, Inc.

Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Bjorn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals fromplastics to the environment and to wildlife. Philosophical Transactions of the Royal Society, B 364: 2027–2045.

Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W., Russell, A. E. (2004). Lost at sea: where is all the plastic?. Science, 304(5672), 838-838.

Thompson, R.C., Moore, C., Andrady, A., Gregory, M., Takada, H., Weisberg, S., 2005. New directions in plastic debris. Science, 310: 1117.

Turnblad, K.M., Chen, Y.A., 1998. Insecticidal Seed Coating, US 5,849,320 a (Google Patents).

Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environmental Pollution, 193: 65–70.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Kohler, A., 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. Environmental Science and Technology, 46: 11327–11335.

Wagner,M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A.D., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. Environmental Science Europe, 26.

Walling, D.E., 2009. The Impact of Global Change on Erosion and Sediment Transport by Rivers: Current Progress and Future Challenges. Unesco.

Watts, A.J., Lewis, C., Goodhead, R.M., Beckett, S.J., Moger, J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. Environmental Science and Technology, 48: 8823–8830.

White, P. J., Brown, P. H. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. Annals of Botany, 105(7): 1073-1080

Willén, A., Junestedt, C., Rodhe, L., Pell, M., Jönsson, H., 2016. Sewage sludge as fertiliser – environmental assessment of storage and land application options. Water Science and Technology (In press).

Zubris, K.A., Richards, B.K., 2005. Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. Environmental Pollution, 138: 201–211.

Zylstra, E.R., 2013. Accumulation of wind-dispersed trash in desert environments. J. Arid Environment, 89: 13–15.

# Oda sıcaklığında çalışan katkılı ZnO ince filmlerin yapısal, morfolojik ve hidrojen gaz algılama analizleri

Irmak KARADUMAN ER*
*Tıbbi Hizmetler Ve Teknikler Bölümü, ,Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Çankırı Karatekin Üniversitesi,
Çankırı, Türkiye
irmakkaradumaner@karatekin.edu.tr

**Özet**

Son yıllarda hidrojen gazı algılama özellikleri geniş çapta araştırılmaya başlanmıştır. Hidrojen gazının patlayıcı bir gaz olmasından dolayı hidrojen gaz sensörü çalışmalarında çalışma sıcaklıklarının düşürülmesi hedeflenmektedir. Bu çalışmada Tungten (W) katkılı ZnO ince filmler kimyasal banyolama tekniği ile %1 ve % 2 katkılı olarak büyütüldü. Morfolojik, yapısal ve optiksel analizleri yapıldı. Farklı çalışma sıcaklıklarında ve oda sıcaklığında hidrojen ($H_2$) gaz algılama özellikleri katkılamanın etkisine bağlı olarak incelendi. Farklı çalışma sıcaklıklarında yapılan ölçümlerde çalışma sıcaklığı 100 °C olarak bulundu. %1 W-katkılı ZnO ince film 100 °C çalışma sıcaklığında diğer ince filmlere kıyasla daha yüksek algılama performansı gösterdi. Sensörler oda sıcaklığında 100 ppm $H_2$ gazına karşı kabul edilebilir düzeyde duyarlılık sergiledi. Ölçüm sonuçları, numunelerin gaz algılama özelliklerinin katkılamaya bağlı olarak değiştiğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Gaz sensör, hidrojen, Kimyasal banyolama metodu

# Structural, morphological and hydrogen gas detection analysis of doped ZnO thin films at room temperature

**Abstract**

In recent years, hydrogen gas detection properties have been widely investigated. Since hydrogen gas is an explosive gas, it is aimed to decrease the operating temperatures in hydrogen gas sensor works. In this study, ZnO thin films with Tungten (W) doping were grown as 1% and 2% doped by chemical bathing technique. Morphological, structural and optical analyzes were done. The hydrogen ($H_2$) gas detection properties at different operating temperatures and room temperatures were examined depending on the effect of the doping. In the measurements were made at different working temperatures and the working temperature was found as 100 °C. ZnO thin film with 1% W-doping showed higher detection performance compared to other thin films at 100 ° C operating temperature. The sensors showed acceptable sensitivity to 100 ppm $H_2$ gas at room temperature. ZnO thin film with 1% W-doping exhibited high repeatability and selectivity at room temperature. The measurement results showed that the gas detection properties of the samples changed depending on the doping.

**Keywords:** Gas sensor, hydrogen, chemical bath deposition method

## GİRİŞ

Hidrojen gazı renksiz, tatsız ve kokusuz bir gazdır, bu nedenle insanlar tarafından kolaylıkla tespit edilemez(). Düşük ateşleme enerjisi ve geniş yanıcı aralığı, kolay tutuşabilir ve patlayıcı olmasına yol açar. Bu nedenle, nükleer reaktörlerin, kömür madenlerinin ve yarı iletken üretiminde hidrojenin üretimi, depolanması ve kullanımı sırasında hızlı ve doğru bir şekilde hidrojen gazı tespiti gereklidir. Hidrojen patlayıcı bir gaz olmasından dolayı oda sıcaklığında çalışan hızlı, ucuz ve düşük güç tüketimi yapan gaz sensörlerinin üretimi oldukça önemlidir.

Gaz sensörlerinin üretiminde genellikle metal oksit yarıiletken malzemeler kullanılmaktadır. Bu MOS malzemelerin arasında 3.37 eV geniş bant boşluğuna sahip olması, taşıyıcılarının yüksek hareket kabiliyeti, yüksek termokimyasal kararlılık ve düşük üretim maliyeti gibi özelliklerinden dolayı en cok ZnO yarı iletken malzemesi tercih edilmektedir (Zhang ve ark. 2010). ZnO metal oksit ince filmlerde katkılama, farklı metotlarda büyütme, UV ışığı etkisi ve farklı kontak konfigürasyonları gibi metotlarla gaz algılama özelliklerinde iyileştirilme yapılabilmektedir. Bunların arasında katkılama en cok tercih edilen metotların

başında gelmektedir. Mn, Cr, W ve Ta gibi geçiş metallerinin katkısı, ZnO'nun stokiyometrisi ile ilgili özellikleri değiştirebilir ve gaz algılama performansını artırabilecek taşıyıcı yoğunluğu ve oksijen boşluğu gibi yüzey kusurlarını arttırır (Ravichandran ve ark., 2020). Bu çalışmada W (tungsten) geçiş metali katkı maddesi olarak kullanılmış ve hidrojen gaz algılama özelliklerine katkısı incelenmiştir.
MOS sensörleri SILAR, Saçtırma, Termal Buharlaştırma ve Kimyasal Banyolama Tekniği vb. farklı yöntemlerle üretilebilmektedir. Bu yöntemlerin arasından kimyasal banyolama tekniği; malzemeyi oluşturan metal iyonları ve sülfitlerin (kalsopritlerin) sulu çözeltilerinin içine daldırılan alttaşların istenen film formu elde edilene kadar uygun ve sabit sıcaklıkta (27-90 ºC) bekletilmesine dayanan film kaplama tekniğidir (Özütok ve Demiri, 2017). Bu yöntem basit, ucuz ve kolay kuruluma sahip olma, vakum süreci gerektirmeme, düzgün şekilli olmayan malzemeleri kaplayabilme, birkaç örneği aynı anda kaplayabilme ve düşük sıcaklıklarda büyütebilme vb. avantajları nedeniyle günümüzde pek çok malzemenin sentezinde tercih edilmektedir. Kimyasal banyo biriktirme (CBD), büyük yüzeylere uygulanabilir, kolay kurulum, vakumsuz ortam, düşük sıcaklıklarda çalışma gibi çekici özelliklerden ötürü diğerler üretim metotlarına kıyasla daha çok tercih edilen bir film sentez tekniğidir (Tian ve ark., 2003). Yapışkan ve homojen film sentezi, öngörülemeyen kimyasal reaksiyonlara bağlı olarak film büyümesini kontrol etmediğinden bu yöntem için temel bir problemdir. Bu nedenle, birçok benzer çalışmada alkali çözeltide kullanılan kompleks ajan tercih edilir (Khallaf ve ark., 2009).

Bu çalışmada %1 ve % 2 katkılı olarak Tungten (W) katkılı ZnO ince filmler kimyasal banyolama tekniği ile büyütüldü. Farklı çalışma sıcaklıklarında ve oda sıcaklığında hidrojen ($H_2$) gaz algılama özellikleri katkılamanın etkisine bağlı olarak incelendi. Sensörler oda sıcaklığında 100 ppm $H_2$ gazına karşı kabul edilebilir düzeyde duyarlılık sergiledi. Ölçüm sonuçları, numunelerin gaz algılama özelliklerinin katkılamaya bağlı olarak değiştiğini gösterdi. Elde edilen sonuçlar incelendi.

## MATERYAL VE METOT

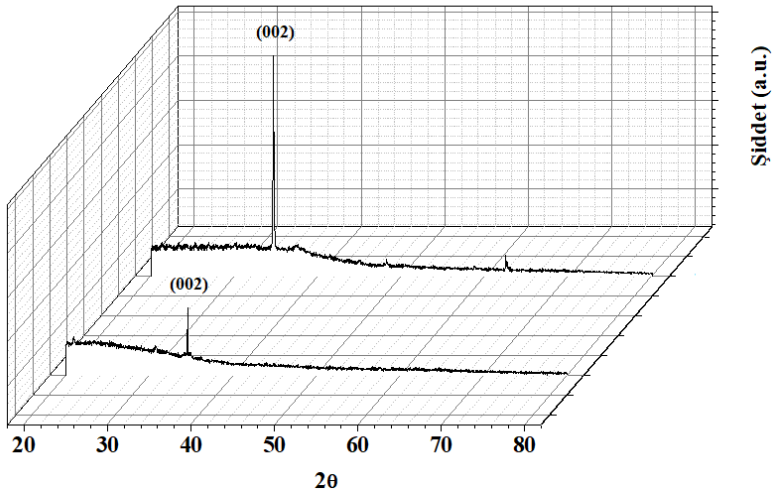
Bu çalışmada ZnO ve W-ZnO ince filmlerinin üretilmesinde kimyasal banyolama tekniği tekniği kullanıldı. İlk olarak kullanılan mikroskop camları önce ethanol sonra aseton ve son olarak saf su konulan ultasonik karıştırıcıda temizlendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Temizlenen camlar şartlı solüsyonda 15 dakika bekletilerek ZnO'in cam yüzeyine daha kolay tutunması hedeflendi. Bu şartlandırma solüsyonu içerisinde amonyak ($NH_3$)/trietilamin (TEA)/saf su oranı 4:2:25 şeklinde ayarlandı. Çinko (Zn) çözelti kaynağı olarak % 98 saflıkta $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$ (çinko asetat dihatrat) kullanıldı. İlk olarak 0,1 M, 100 ml. çinko sulu çözeltisi hazırlandı. Manyetik karıştırıcı ile karıştırılan % 26'lık 10 ml. amonyum hidroksit ($NH_4OH$) çözeltisi damla damla eklendi. Çinko kaynağını alkalin yapmak için amonyak eklendi (Özütok ve Demiri, 2017).. Amonyak eklendikçe süt beyazı görünümünden renksiz hale geçmektedir ve bu çözeltinin pH değeri 10'dur. Ardından bu çözeltiye 500 ml. oluncaya kadar saf su ilave edildi ve $(NH_4)_2ZnO_2$ banyosu elde edildi. Ertesi gün çözelti incelendiğinde $Zn(OH)_2$'in dipte beyaz çökelti oluşturduğu gözlendi. 20 ml. bu hazırlanan çözeltiden ve 60 ml. saf sudan alınarak beherde karıştırılan çözelti 50±5 ˚C (pH 9,8) sıcaklıkta manyetik karıştırıcı üzerine alındı. Filmler şartlı çözeltiden alınıp bu karışımın içine daldırıldı ve 5 dakika bekletildi. Ardından oda sıcaklığında bir gün kurumaya bırakılan filmler ertesi gün 100 ºC'de etüvde kurutuldu. Böylece yüzeye zayıf yapışmış yapılar yüzeyden uzaklaştırıldı. Böylelikle ZnO gövde tabaka elde edildi (Özütok ve Demiri, 2017). Kimyasal banyo biriktirme ile üretilen W katkılı ZnO filmlerde sırasıyla çinko asetat dihidrat ve sodyum tungstat dihidrat çinko ve tungsten kaynakları olarak kulanıldı. Üst kısımda anlatılan ZnO gövde tabaka sentezi prosedürü Özütok ve diğerleri tarafından detaylıca açıklandı (Özütok 2016). ZnO gövde tabaka tavlaması, 1 saat boyunca 500 ° C'de gerçekleştirildikten sonra, 40 ml saf su içerisinde de tungsten çözeltileri (molar oranlar:% 1 ve% 2) hazırlandı. pH = 9 olması için amonyum fosfat dibazik kompleks ajan olarak kullanıldı. ZnO gövde tabaka tungsten çözeltilerine daldırılarak bırakıldı. 1 saat boyunca 70 ° C'de manyetik karıştırıcıya ısıtıldı. 1 gün bekletildikten sonra, kurutulmuş numuneler 2 saat boyunca 500 ° C'de fırında tavlandı.

Gaz Sensör ölçüm sistemi Keithley 2400, gaz ölçümleri için modifiye edilmiş sensör hücresi, bilgisayar, LakeShore 325 sıcaklık kontrol cihazı, MKS akış kontrolcüleri (MFC), Keysight E4990A empedans ölçüm cihazı, yüksek saflıkta kuru hava, NO gazı ve vakum pompasından oluşmaktadırSensör hücresi; numune tutucu, hedef gazın giriş ve çıkışını sağlayan gaz vanaları ve sensörün Keithley 2400 cihazı ile Keysight E4990A empedans cihazına bağlanabilmesi için BNC konnektörlerden oluşur. Sensörün sıcaklığını tespit edebilmek için yarıiletken sensör bağlantı uçları, malzemenin gerektiğinde ısıtılabilmesi için Lakeshore 325 sıcaklık kontrolcüsüne ait bağlantı uçları da ayrıca sensör hücresinde mevcuttur. Gaz algılama ölçümleri Keithley 2400 cihazı kullanılarak alındı. Öncelikle büyütülen sensörler sensör hücresine yerleştirildi.

Lakeshore 325 sıcaklık kontrolcüsü kullanılarak hücreye yerleştirilen sensörler belirlenen sabit sıcaklık ortamında tutuldu. Sensör yüzeyine gaz akışı, (MKS) gaz basınç ve akış kontrolcüleri kullanılarak sağlandı. Akış kontrolcüleri kullanılarak istenilen hedef gaz konsantrasyonları ayarlandı ve gaz ölçümleri yapıldı. Gaz ölçümlerinin ardından empedans ölçümleri alındı.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Şekil 1'de % 1 W-katkılı ZnO ve (b) % 2 W-katkılı ZnO ince filmlerin XRD analizleri verilmektedir. Üretilen filmlerin polikristal yapı olarak büyüdüğünü belirten (002) piki açıkça grafikten elde edilmektedir.




**Şekil 1.** Üretilen filmlerin XRD analizleri

Üretilen filmlerin XRD data analizleri verilmektedir. Kristal tanecik boyutu (002) piki temel alınarak Debye-Scherrer formülü ile hesaplandı (Velázquez-Nevárez ve ark., 2016);

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos\theta} \qquad (1)$$

% 1 W-katkılı ZnO ve % 2 W-katkılı ZnO ince filmlerin tanecik boyutları 61,35 ve 58,02 olarak hesaplandı. Boyuttaki bozulma çoğunlukla, ZnO kafesindeki yabancı kirliliklerin, yani W'nın, ZnO ince filmlerinin çekirdeklenmesini ve müteakip büyüme hızını azaltarak bozulmasıyla ilişkilidir.
$d_{hkl}$ değerleri Bragg formülü kullanılarak hesaplandı (Bazta ve ark.,2019);

$$2d_{hkl} \sin\theta = n\lambda$$
(2)
% 1 W-katkılı ZnO ve % 2 W-katkılı ZnO ince filmlerin $d_{hkl}$ değerleri 2.5730 ve 2.5864 olarak hesaplandı. Dislokasyon yoğunluğu ve ε (microstrain) aşağıdaki denklemler yardımı ile hesaplandı (Hassan ve ark., 2019 ; Lee ve ark., 2005);

$$\delta = \frac{1}{D^2}$$
(3)

$$\varepsilon = \frac{\beta}{4\tan\theta}$$
(4)

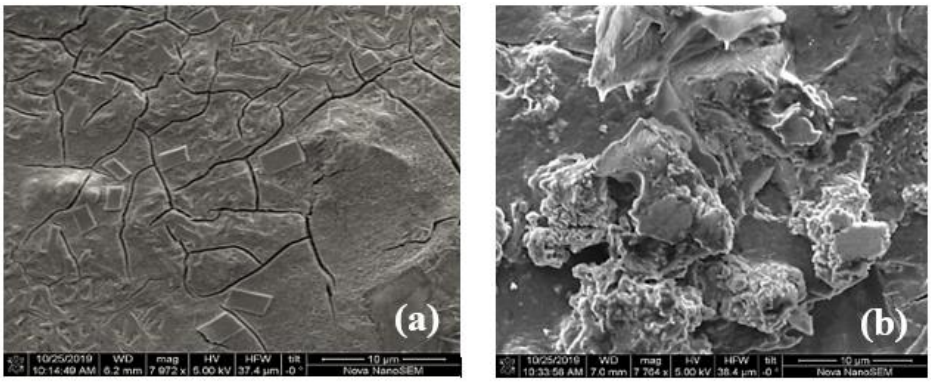
ε (microstrain) değerinin, denklem 4'te gösterildiği gibi hem β hem de tanθ'ya bağlı olduğuna dikkat edilmelidir. Dislokasyon yoğunluğu kristallenmenin ölçüsü olarak düşünülebilir (Lee ve ark., 2005). % 1 W-

katkılı ZnO ve % 2 W-katkılı ZnO ince filmlerin 2.64 ve 2.97 ($x10^{-4}$) olarak hesaplanmıştır. Değerler birbirine yakın olduğu görülmektedir.

**Tablo 1.** Üretilen filmlerin XRD data analizleri

| ***Örnek*** | ***(hkl)*** | ***2θ*** | ***D(nm)*** | ***FWHM*** | ***d(Angstron)*** | ***δ*** ***($x10^{-4}$)*** | ***ε*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % 1 W | (002) | 34.83 | 61.35 | 0.2631 | 2.5730 | 2.64 | 0.2097 |
| % 2 W | (002) | 34.64 | 58.02 | 0.2781 | 2.5864 | 2.97 | 0.2229 |

Şekil 1'de % 1 W-katkılı ZnO ve (b) % 2 W-katkılı ZnO ince filmlerin SEM analizleri verilmektedir. Filmlerin yüzeye homojen olarak dağıldığı görülmektedir. % 1 W-katkılı ZnO ince filmde dikdörtgen tarzı yapıların oluştuğu görülürken , % 1 W-katkılı ZnO ince filmde üst üste yığılmış bulut tarzında yapıların oluştuğu görülmektedir.

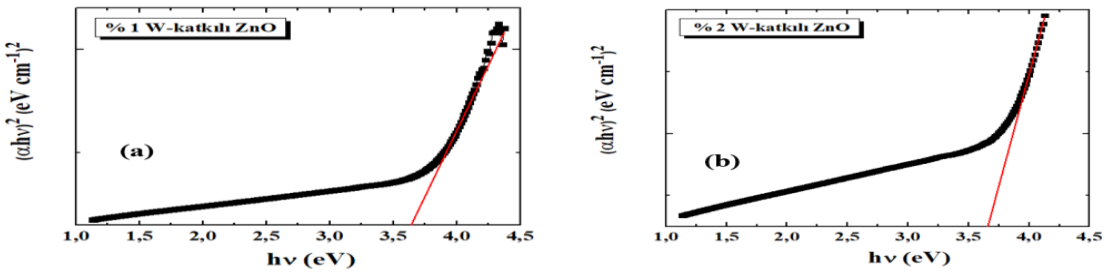



**Şekil 2.** Üretilen filmlerin SEM analizleri

Şekil 3'de % 1 W-katkılı ZnO ve (b) % 2 W-katkılı ZnO ince filmlerin optik band aralığı grafikleri verilmektedir. Direkt geçişlerde eksiton oluşumu veya elektron-hol etkileşimi dikkate alınmazsa absorpsiyon katsayısı $\alpha$, gelen fotonun enerjisine ifadesiyle bağlıdır. Filmlerin optik bant aralığı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\alpha h\vartheta = A\left(h\vartheta - E_g\right)$$

Bu formülde $h\upsilon$, foton enerjisi, A sabit ve n=1/2 (direk geçişler için)' dir. Şekil 3'de, üretilen sensörler için oda sıcaklığında yapılan soğurma ölçümleri kullanılarak $(\alpha h\nu)^2$ $(eVcm^{-1})^2$ 'nin enerjiye bağlı grafikleri çizildi. Grafiklerden filmlerin yasak enerji aralıkları hesaplandı.

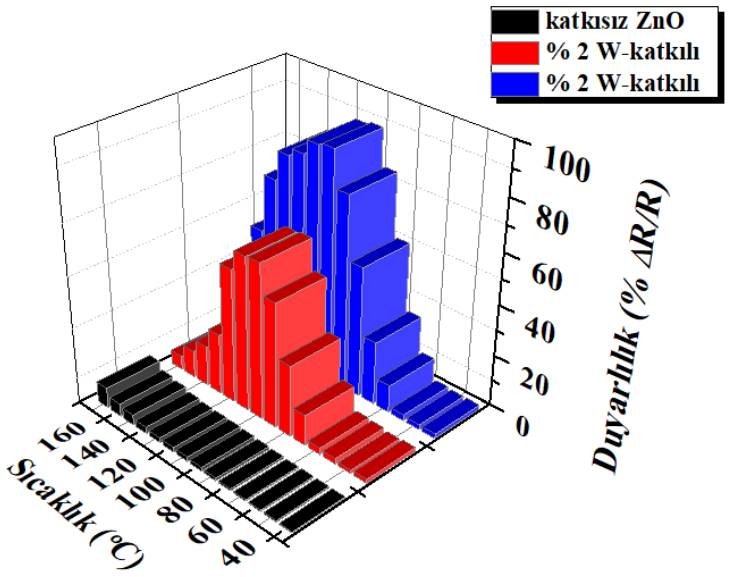



**Şekil 3.** Üretilen filmlerin optik band aralığı grafikleri

**Tablo 1.** Üretilen filmlerin optiksel yasak enerji aralıkları

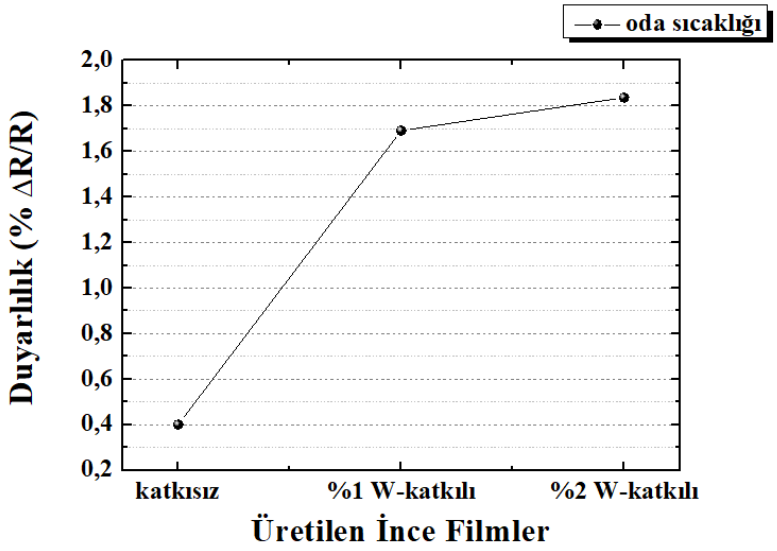
| Örnek | Eg (eV) |
|---|---|
| % 1 W | 3,64 |
| % 2 W | 3,66 |

Çalışma sıcaklığı gaz sensörü uygulamalarında kritik bir parametredir. Hedef gaz moleküllerinin enerjisi oda sıcaklığından yüksek çalışma sıcaklıklarına kadar artar. Yüzey reaksiyonlarını ve önemli hassasiyeti elde etmek için sıcaklığın arttırılması gereklidir. Bununla birlikte, çok yüksek sıcaklıklar malzeme yapısını bozabilir, yüksek güç tüketimine yol açabilir ve sensörün ömrünü etkileyebilir. Şekil 4'de üretilen filmlerin sıcaklık-duyarlılık grafiği verilmektedir. Sıcaklık arttırıldığında başlangıçta duyarlılıklarda artış olurken optimal çalışma sıcaklığından sonra duyarlılıklarda düşüş gözlendi. Bu durum, gaz molekülleri ile oksijen iyonları arasındaki reaksiyonun çok hızlı bir şekilde olmasından ve yüzeye hedef gaz moleküllerinin difüzyonunun yeterli miktarda olmamasından kaynaklanır. Optimal çalışma sıcaklığından yüksek sıcaklıklarda, yük taşıyıcı konsantrasyonu artar, Debye uzunluğu azalır sonuç olarak duyarlılıklarda azalma gözlenir. Çalışma sıcaklığı 100 °C olarak tespit edildi.




**Şekil 4.** Üretilen filmlerin sıcaklık-duyarlılık grafiği

Şekil 5'de üretilen filmlerin oda sıcaklığında 100 ppm hidrojen gazı için duyarlılık grafiği verilmektedir. Katkısız , % 1 W-katkılı ve % 2 W-katkılı ZnO ince filmlerin oda sıcaklığında duyarlılıkları sırasıyla 0,4 , 1,7 ve 1,9 olarak hesaplandı.




**Şekil 5.** Üretilen filmlerin oda sıcaklığında 100 ppm hidrojen gazı için duyarlılık grafiği

Gaz sensör algılama mekanizması genel olarak oksijen molekülllerinin yüzeye tutunması ve hedef gaz/oksijen molekülleri etkileşimi olarak iki ana kısımda incelenmektedir (Karaduman ve ark. 2019) . Algılama mekanizmasına bakmaksızın bir gaz sensörünün cevap karakteristiği hedef moleküller ile ara yüzey olarak kullanılan algılayıcı madde arasındaki etkileşmenin doğasına bağlıdır. Bu etkileşmelerin türünün bilinmesi arayüzey maddesinin tasarımı için önemlidir. Bu değişimlerin meydan gelmesi sonucunda elektrik direncinin ölçülmesi ile hedef gaz konsantrasyon değişimi belirlenebilmektedir. Metal oksit gaz sensörlerinde, havadaki küçük oranlı gaz moleküllerinin varlığında, iletkenlik bandı ile adsorbe edilmiş parçacıklardaki değişimden dolayı serbest parçacık yoğunluğundaki fark, aktif tabakadaki elektriksel dirençte bir değişim meydana getirir. Çinko oksit ince filmlerin elektriksel özellikleri üzerinde oksijenin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Oksijen iyonunun çinko oksit yüzeyine tutunması ile iletim bandındaki elektron sayısını azalttığı ve böylece çinko oksitin iletkenliğinin azaldığı bilinmektedir. İndirgeyici gazlara karşı çinko oksitin algılama mekanizması aşağıdaki gibi tanımlanmaktadır. İlk olarak $O_2^-$ , $O^{2-}$ ve $O^-$ gibi aktif oksijen türleri yüksek sıcaklıkta çinko oksit yüzeyine tutunurlar. Oksijenin kimyasal tutunması sıcaklığa oldukça fazla bağlıdır. Düşük sıcaklıklarda (130°C ~ 180°C), $O_2^-$ aktif oksijen türü kimyasal tutunma gerçekleştirir. Yüksek sıcaklıklarda ise genellikle diğer aktif oksijen türleri kimyasal tutunma gösterirlerken, $O_2^-$ hızlıca kaybolur. Hidrojen gazı sisteme girdiğinde; $H_2$ molekülleri ZnO yüzeylerinde doğrudan oksijen iyonlarıyla reaksiyona girer. Bu nedenle direnç modülasyonu, sensörün tepkisine katkıda bulunur. Direncin değişmesine yol açar.

## SONUÇ

Bu çalışmada W-katkılı ZnO ince filmler kimyasal banyolama tekniği ile %1 ve % 2 katkılı olarak büyütüldü ve hidrojen gaz gaz algılama özellikleri incelendi. Sensörler oda sıcaklığında 100 ppm $H_2$ gazına karşı kabul edilebilir düzeyde duyarlılık sergiledi. %1 W-katkılı ZnO ince filmin hidrojen gaz algılama çalışmalarında kullanılabilecek sensör malzemesi olduğu görüldü.

## TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Gaz Sensör Laboratuarındaki, gaz sensör ölçüm sisteminin kullanılmasına izin veren Sayın Prof. Dr. Selim ACAR'a çok teşekkür ederim. Ek olarak sensör malzemelerinin büyütülmesinde emeği geçen ve yardımlarını asla esirgemeyen Sayın Arş.Gör.Dr. FATMA SARF'a çok teşekkür ederim

## KAYNAKLAR

Zhang H., Liu H., Lei C., Yuan C., Zhou A., 2010, Tungsten-doped ZnO transparent conducting films deposited by direct current magnetron sputtering, Vacuum 85 (2), 184-186.

Ravichandran K., Jansi Santhosam A., Sridharan M., 2020. Effect of tungsten doping on the ammonia vapour sensing ability of ZnO thin films prepared by a cost effective simplified spray technique Surfaces and Interfaces, 18, 100412

Özütok F., Demırı S.2017. Nanoflower-Lıke Zno Fılms Prepared By Modıfied Chemıcal Bath Deposıtıon: Synthesıs, Optıcal Propertıes And $NO_2$ Gas Sensıng Mechanısm, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 12 (2) : 309-317.

Tian Z. R., Voigt J. A., Liu J., Mckenzie B., Mcdermott M. J., Rodriguez M. A., Konishi H., Xu H., 2003. Complex and oriented ZnO nanostructures, Nature Materials, 2: 821-826.

Khallaf H., Chai G., Lupan O., Heinrich H., Park S., Schulte A., Chow L., 2009. Investigation of chemical bath deposition of ZnO thin films using six different complexing agents, Journal of Physics D: Applied Physics, 42: 135304.

Özütok F., 2016. Sensör Uygulamaları İçin Metal Oksit İnce Filmlere Metal Ve/Veya Karbon Nanotüp Modifikasyonu İle Nanokompozitlerin Eldesi, ÇÖMÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi,90s,

Velázquez-Nevárez G.A., Vargas-García J. R, Aguilar-Hernández J., Vega-Becerra O. E., Chen F., Shen Q., Zhang L., 2016 Optical and Electrical Properties of (002)-Oriented ZnO Films Prepared on Amorphous Substrates by Sol-Gel Spin-Coating, Materials Research. 19(Suppl. 1), 113-117.

Bazta O., Urbieta A., Piqueras J., Fernández P., Addou M., Calvino J.J., Hungría A.B., 2019. Influence of yttrium doping on the structural, morphological and optical properties of nanostructured ZnO thin films grown by spray pyrolysis, Ceramic International 45 6842-6852

Lee S. W., An S. Y., Shim I.-B., Sung Kim C., 2005, Mossbauer studies of La–Zn substitution effect in strontium ferrite nanoparticles, J. Magn. Magn. Mater., 290,231.

Hassan E. S., Mubarak T. H., Abass K. H., Chiad S. S., Habubi N. F., Rahid M. H., Khadayeir A. A., Dawod M. O., Al-Baidhany I. A., 2019. Structural,Morphological and Optical Characterization of Tin Doped Zinc Oxide Thin Film by (SPT), The 1st International Scientific Conference on Pure Science IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series 1234, 012013.

Karaduman Er I., Çağırtekın A.O., Çorlu T., Yıldırım M.A., Ateş A., Acar S., 2019. Low-level NO gas sensing properties of $Zn_{1-x}Sn_xO$ nanostructure sensors under UV light irradiation at room temperature, Bulletin Materials Science, 42: 32.

# Genetic stability determination of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck one-year old *in vitro* culture clones via ISSR markers

Sevinc GULDAG[1]*, Ergun KAYA[1]

[1]Mugla Sitki Kocman University, Faculty of Science, Molecular Biology and Genetics Department, Mugla, Turkey

*Corresponding author e-mail: sevincguldag@posta.mu.edu.tr

**Abstract**

*Citrus* being member of Rutaceae family have been used for food, medicinal, herbal and other agricultural purposes for centuries. *In vitro* propagation systems are useful tools for clonal propagation of difficult species such as woody plants and these tools can offer many economic advantages for mass production of plant species, however, the resulting *in vitro* regenerated plants sometimes may show somaclonal variation. For traditional planting strategies, the micropropagated plants should be same with the mother plant. For this reason, confirmation of genetic stability is crucial for *in vitro* propagated plants. There are many protocols such as morphological, cytological, physiological, biochemical and molecular procedures for determination of somaclonal variation within micropropagated plants and they have been successfully used in several species. Molecular marker systems have been useful tools to determine genetic stability of *in vitro* grown clones after subculturing periods. A number of molecular marker techniques, including random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeats (SSR) and inter-simple sequence repeats (ISSR), have been developed and used to determine genetic stability for *in vitro* propagated plant species. ISSR analysis involves the use of SSR motifs in order to prime the polymerase chain reaction (PCR) and thereby amplify regions between adjacent, but inversely oriented, microsatellites and these markers have been successfully used for genetic stability analysis of many plant species. In this study, ISSR markers were used for genetic stability determination of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck *in vitro* clonally propagated a period of 12 months. The total of 13 ISSR primers were assayed and the reproducible bands were obtained from 7 of them. The determined genetic stability were 100%.

**Keywords:** *Citrus sinensis*, genetic stability, ISSR, micropropagation, molecular marker, somaclonal variation

## INTRODUCTION

*Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sweet orange) containing large amounts of vitamin C having the antioxidant activity and potassium, is mostly used for high blood pressure, stroke prevention, asthma and high cholesterol. Additionally, because sweet orange fruit peels have aromatherapy effect, they are used to to help with depression, sleep and anxiety (Neuhofel et al., 2002; Dallas et al., 2014; Xiong et al., 2018).

*In vitro* clonal propagation of cells, tissues, organs and whole plant mean to be cultured explants under controlled nutritional, environmental and aseptic conditions. These controlled *in vitro* conditions provide optimum environment for maximum growth and multiple clonal propagation of economic important, medicinal-aromatic, rare, endemic, endangered etc. plant species, and they also ensure to be obtained true-to type of the selected genotype (Thorpe, 2007; Kaya et al., 2018).

Plant tissue culture technology is an useful tool for *in vitro* clonal propagation of different plant species, however, *in vitro* regenerants sometimes may show somaclonal variations. Micropropagation of elite genotypes having excellent properties needs high degree of genetic fidelity among *in vitro* grown plants. The somaclonal variations occurring during clonal propagation are disadvantages for multiple cloning of economic important, medicinal and aromatic plant species, therefore, the determination of genetic stability/variability of micropropagated plant species is critical point (Ozudogru et al., 2011; Kaya and Souza, 2017).

There are several protocol based on morphological, cytological, physiological, biochemical and molecular approaches to determine the genetic stability/variability resulted by tissue type, *in vitro* manipulations, and culture conditions. Molecular aproaches being DNA based marker systems such as RAPD, SSR, AFLP, and ISSR are useful tools to determine genetic variations. The main advantage of molecular marker systems is

practical analysis, because obtained results can be repeated easily between different laboratories (Alizadeh et al., 2015; Kaya, 2015).
In this work was aimed to determine genetic stability of *C. sinensis* (L.) Osbeck one-year old *in vitro* culture clones using ISSR marker. This manuscript derived from results of a part of Sevinc Guldag's master's thesis works.

## MATERIALS AND METHODS

### DNA isolation

DNAs of *in vitro* grown *C. sinensis* (L.) Osbeck samples were extracted using CTAB based rapid isolation method including grinding dry samples with liquid nitrogen (Khanuja et al, 1999). The method was modified using extra treatment with chloroform:isoamyl alcohol:phenol (24:1:5%) and concentrations of genomic DNA samples were meassured using Nanodrop spectrophotometer and DNAs were diluated to 40ng/µl (Kaya and Yilmaz Gokdogan, 2016).

### PCR protocol

The total of 13 ISSR primers (Martins-Lopes et al. 2009, Smykal et al. 2011) were used for PCR reactions and the reactions carried out in a 25 µl total reaction mixture containing 40ng DNA template, 0.4mM ISSR primer, 0.4 mM of each dNTP, 1xPCR Buffer including 2.5 mM $MgCl_2$ and 1 Unit Taq DNA polymerase. DNA amplification was performed via a gradient thermocycler (Heal Force, T960) under the following conditions: initial denaturation cycle of 3 min at 95 ºC followed by 35 cycles for 15 sec at 95 °C, 30 sec at 55 °C and 3 min at 72 °C; a final extension for 10 min at 72 °C (Kaya, 2015; Kaya and Souza, 2017).

### Data analysis

PCR products were separated on a 1.5% agarose gel containing 1 × TAE buffer [40 mM Tris (pH 7.6), 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA] and 0.5 µg/ml ethidium bromide for 4 hours at 80 V. The band profiles were visualized under UV light, and monitored with image analysis system (Major Science/ UVCl-1100) and scored by their absence (0) or presence (1). The unweighted pair-group method by arithmetic averages (UPGMA) from the similarity data matrices using Jaccard's coefficient were used for cluster analyses to obtain distance tree dendograms (D-UPGMA, 2002).

## RESULTS and DISCUSSION

ISSR markers were used for genetic stability determination of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck *in vitro* clonally propagated a period of 12 months (Figure 1). The total of 13 ISSR primers were assayed and the reproducible bands were obtained from 7 of them. The determined genetic stability were 100% (Figure 2).

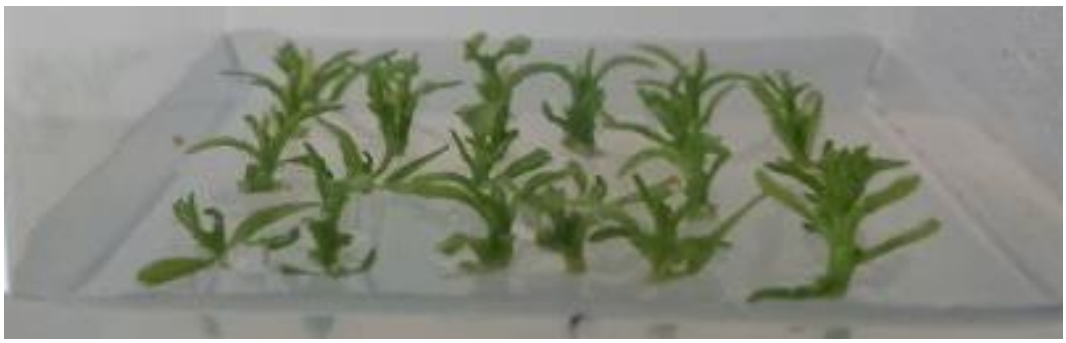


**Figure 1.** Shoots of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck *in vitro* clonally propagated a period of 12 months

Micropropagated plant species, derived from shoot tips, are thought to maintain their genetic fidelity during cell differentiation and cell division during propagated in vitro culture conditions (Ostry et al. 1994). But, their somaclonal variation risks induced by *in vitro* stress conditions, plant growth regulator treatments and medium compositons can not be ignored (Modgil et al., 2005).

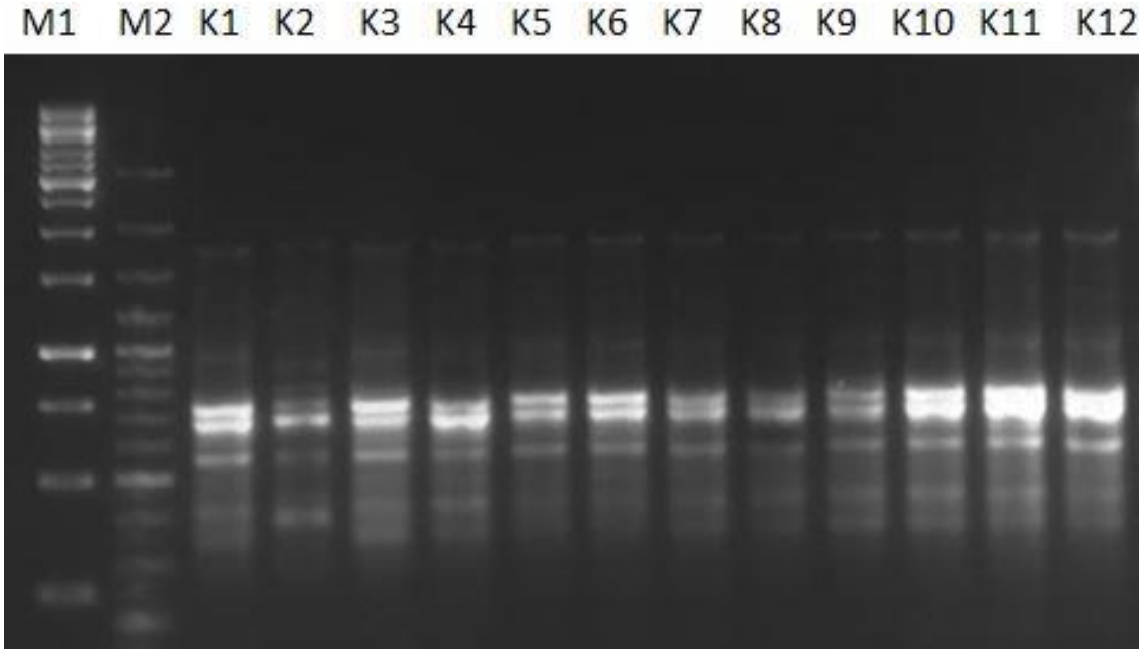



**Figure 2.** ISSR PCR amplification products obtained from DNAs of CBP Clone 3 of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck *in vitro* clonally propagated a period of 12 months (K1-12) with ISSR 5 primer were visualized on 1.5% agarose gel; M1, 1 kb DNA ladder; M2, 100 bp DNA ladder.

## CONCLUSION

There are many work to determine genetic stability among *in vitro* propagated plant species (Gimenez et al. 2001), and many of them indicated the maintenance of genetic stability (Javounhey et al. 2000; Ozudogru et al., 2011). These variations are not desired, as they are often heritable and this variations may be maintained during clonal propagation procedures. Because of the genetic stability importance, the current study shows to be highly stable *in vitro* propagated plantlets are true to type to the mother plant.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by Mugla Sitki Kocman University, Scientific Research Projects Coordination Unit (Mugla, Turkey, MSKU-BAP, Project Number: 19/076/05/1/2).

## REFERENCES

Alizadeh M, Krishna H, Eftekhari M, Modareskia M, Modareskia M 2015. Assessment of clonal fidelity in micropropagated horticultural plants, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(12): 977-990.

Dallas C, Gerbi A, Elbez Y, Caillard P, Zamaria N, Cloarec M 2014. Clinical study to assess the efficacy and safety of a citrus polyphenolic extract of red orange, grapefruit, and orange (Sinetrol-XPur) on weight management and metabolic parameters in healthy overweight individuals. Phytotherapy Research, 28(2): 212-218.

Kaya E 2015. ISSR Analysis for Determination of Genetic Diversity and Relationship in Some Turkish Olive Olea europaea L Cultivars. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 43(1): 96-99.

Kaya E, Galatalı S, Guldag S, Ozturk B, Ceylan M, Celık O, Aktay I 2018. Mass production of medicinal plants for obtaining secondary metabolite using liquid mediums via bioreactor systems: SETIS™ and RITA®. Turkish Journal Of Scientific Reviews, 11 (2): 12-17.

Kaya E, Souza FVD 2017. Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 53:410–417.

Kaya E, Yilmaz Gokdogan E 2016. Using Two Retrotransposon Based Marker Systems (IRAP and REMAP) for Molecular Characterization of Olive (Olea europaea L.) Cultivars. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 44 (1): 167-174.

Khanuja SPS, Shasany AK, Darokar MP, Kumar S 1999. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. Plant Molecular Biology Reporter 17: 1–7.

Martins-Lopes P, Gomes S, Lima-Brito J, Lopes J, Guedes-Pinto H 2009. Assessment of clonal genetic variability in Olea europaea L. 'Cobrançosa' by molecular markers. Scientia Horticulturae 123: 82–89.

Modgil M, Mahajan K, Chakrabarti SK, Sharma DR, Sobti RC 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. Scientia Horticulturae, 104: 151–160.

Neuhofel AL, Wilton JH, Victory JM, Hejmanowsk LG, Amsden GW 2002. Lack of bioequivalence of ciprofloxacin when administered with calcium-fortified orange juice: a new twist on an old interaction. The Journal of Clinical Pharmacology, 42(4): 461-466.

Ostry ME, Hackett W, Michler C, Serres R, McCown B 1994. Influence of regeneration method and tissue source on the frequency of somatic variation in *Populus* to infection by Septoria musiva. Plant Science, 97: 5222–5226.

Ozudogru A, Kaya E, Kırdok E, Issever-Ozturk S 2011. *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme *Thymus vulgaris* and *T. longicaulis* resulting in genetically stable shoots. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 47:309–320.

Smykal P, Bacova-Kerteszova N, Kalendar R, Corander J, Schulman AH, Pavelek M 2011. Genetic diversity of cultivated flax (linum usitatissimum L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. Theoretical and Applied Genetics 122: 1385– 1397.

Thorpe T 2007. History of plant tissue culture. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 37: 169-180.

Xiong M, Li Y, Tang P, Zhang Y, Cao M, Ni J, Xing M 2018. Effectiveness of aromatherapy massage and inhalation on symptoms of depression in Chinese community-dwelling older adults. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 24(7): 717-724.

**Exploring mutable *TREX1* gene in systemic lupus erythematosus patients**

*MSc. Atheer Ahmed Majeed, **MSc. Amjed A. Majeed
*Department of biology/ College of sciences/University of Baghdad
**Department of biotechnology/ College of sciences/University of Baghdad

## Abstract

The aggressive effects of autoimmune diseases such as lupus erythematosus (SLE) might cause highly relevant apoptosis as one effect in 18-20 patients age.

A mutation in *TREX1* (DNase III) like the responsible exonuclease for DNA degrading during apoptosis initiated by the most abundant cytotoxic of immune responsibility like T lymphocyte and natural killer cell protease may effect on improper excision of flux DNA . we reported the identification of a missense mutation in *TREX1* gene caused effector ways responsible for autoimmune destruction of healthy cells. Mutable *TREX1* Nucleotides sequences were determined by the chain termination method for 3 patients for exploring the differential Nucleotides were compared with three healthy control.

## Introduction

*TREX1* gene is a exonuclease has involved (DNase III) played main roles to participate in several lesions in autoimmune response to oxidative stress and apoptosis processing , it mapped genetic locus to chromosome 3p21. It is active as a homodimer like part of a protein complex (SET complex) which is translocated to the nucleus in replay to gra-enzyme A-mediated cell death (Cooper GS, *et al*.,2002). Moreover, The studies suggested that in vivo expereimantly the virulent of autoimmunity in some patients with SLE increased oxidative activity may generate a chemical changes in the endogenous DNA (Karasinska, J. M., 2006)

Mutations in the *TREX1* gene in allele were observed in patients with (SLE) didn't only in two alleles (M. A. Lee-Kirsch, *et al*., 2007) , Recent advances to explicative the genetics complicating of SLE may has the mechanical pathways implicated in this disease . Defects in immune complex excision have included B-cell tolerance, and T-cell function have been demonstrated. It is also thought that the major histocompatibility complex (MHC) plays a princiable roles in the genetic susceptibility like this disorder (M. Morita, G. *et al*., 2004) . Subsequently, A binary role of *TREX1* as DNA-degrading enzymes in apoptosis and phagocytosis , it probably as cytosolic DNA sensor may explain how dual *TREX1* function could induce an environment in autoimmunity is perpetually induced and continued DNase found to be common with SLE (D. Chowdhury, *et al*.2006). Mutations in the gene encoding

DNase III, the most abundant extracellular DNase cause SLE in humans and mice (B. Namjou, *et al*., 2011, Caza T, *et al*.,2014).

*TREX1* in major mammalian intracellular DNAseIII like homodimer causes single-stranded DNA damage during caspase-independent apoptosis activated by other enzymes. All suggestions that segregate DNA processing and caspase-independent apoptosis could trigger an autoimmune response. (Chowdhury D, *et al*.,2006).

We sequenced in this study the coding region of *TREX1* in three patients gave informed consent to identified three heterozygous missense or nonsense changes have one frameshift changing in SLE individuals compared with three non - equivalent changes in controls (B. de Vries, *et al*.2010) . We followed all previous studies about missense changes affect highly conserved residues except in the German SLE groups, the statement discovered four heterozygous missense changes, one frameshift and a single 3' UTR variant in 6/199 affected samples but only 2/1,512 controls . and identified one additional missense change in a completely conserved residue that was not noted in any of the control groups studied (U. de Silva, *et al*.,2007). Ultimately our study sequenced *TREX1*gene in 3 Iraqi patients to detect any nonequivalent change in these individuals. The absence of nonsynonymous alterations may be will explain by the different demographic functional analysis has been performed in vitro for some of these DNAseIII mutations .

## Martials and methods

### 2.1- SlE genome extraction and mutable *TREX1* gene determination

It has Made certainty step to 3 SLE patients infection utilized rising Antibodies amount in blood serum detected about IgM essay diameter using radial immuno-diffusion plate method.

Between (1-1.2 ng/µl) DNA extraction from blood serum of 3 Iraqi SLE patients used Quick-DNA™ Blood MiniPrep Catalog and of healthy serum ( control ) was employed to confirm through genotypic diagnosis of mutable *TREX1* gene by species-specific primer (*TREX1 F*. 5'-GGG CGT CAA TGT TTT GAT GA- 3') and (*TREX1 S*. 5'-GGG CGT CAA TGT TTT GAT GA- 3').

The PCR reaction consist of (25 µl) PCR reaction mixture used INtRON's Maxime PCR PreMix Kit, it was following an initial 94°C for 4-min , a *TREX1* gene fragment was amplified by 30 cycles of denaturing at 94°C (30 s), annealing at 65°C (30 s), and extension at 72°C (1 min).

### 2.2 Gene sequencing

Produced DNA of the purified PCR amplicons were sequenced using fluorescent dye terminator chemistry on sequencer and analyzed .

Prime repair exonuclease *TREX1* was matched with NCBI's nucleotide database (www.ncbi.nlm.gov/nucleotide) and included in the multiple alignment using the (clone manager demo 9.2) software program .

## The results

### 3.1 Mutable *TREX1* gene Identification

In this study has Made certainty step to 3 SLE patients infection utilized rising Antibodies amount in blood serum detected about IgM essay diameter that its appeared IgM concentrations were higher before SLE treatment than after treatment using (table 1)

Total DNA have extracted from Iraqi patients blood serum was performed to use amplifying for mutable *TREX1*gene. Primers of conserved region of *TREX1*gene were designed and used for amplification of DNA, PCR products were separated on 2% agarose gel, the results of electrophoresis were documented in (Fig. 1 ,2 ), they were demonstrated that mutable *TREX1*gene had subsequently bands were a proximally (400 -410 bp). The control is *TREX1* gene of healthy person like three prime repair exonuclease 1 chromosome 3.( M. Christmann, *et al*.,2010).

**Table 1**:- its shown IgM concentrations were higher before SLE treatment than after treatment using in blood serum of SLE patients

| Groups | IgM mg/dl |
|---|---|
| **Control** | **49.2** |
| **1before treatment** | **53.4** |
| **2 before treatment** | **57.8** |
| **3 before treatment** | **62.2** |
| **1after treatment** | **45** |
| **2 after treatment** | **49.2** |
| **3 after treatment** | **49.2** |

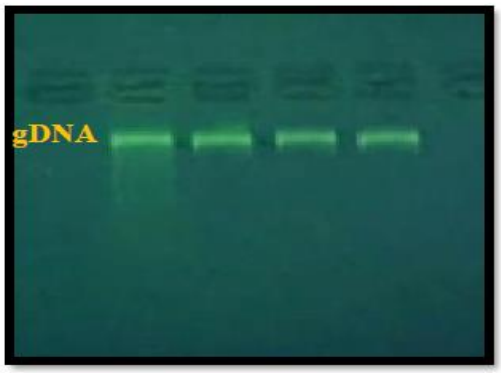



**Figure 1: Gel electrophoresis of genomic DNA extraction from blood 1% agarose gel at 30 min.**

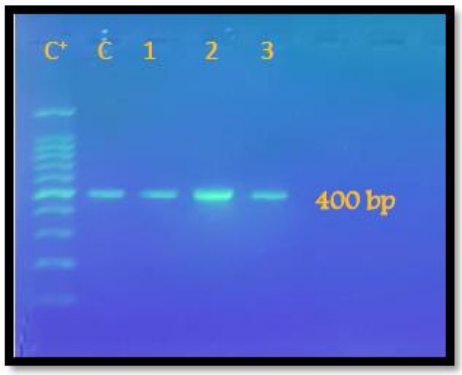



**Figure (2) : PCR product of mutable *TREX1* gene was electrophoresed on 2% agarose at 5 volt/cm$^2$. C$^+$: DNA ladder (100). Lane C:healthy *TREX1* gene (400bp),Lane( 1 -3): patients *TREX1* gene (409,402,401 bp) .**

### 3.2 – Sequences analysis of Mutable *TREX1*gene

This work stems from recent articles which strongly searching a role of *TREX1* in autoimmune diseases in Iraqi patients . therefore, we analyzed patients DNA affected by one autoimmune diseases like SLE.

Knowledge of the genetic contributions to SLE hazard has grown consequencly over the previous decade, and has gaven a share in recent improvement in conception the role of genetic risk factors for SLE. Each susceptibility gene exiting in an individual's genome gives share to that individual's relative risk of progressing SLE and can influence strem of disease onset and clinical manifestations (G. Ramantani, *et al*.,2010). Therefore, utilization of the sequencing techniques and exploration of gene-gene interactions are predicated to clear a large of the "missing heritability" (Vaughn SE, *et al*.,2011) in SLE.(fig 3 A)

This study has depended on identify the *TREX1* missense mutations, in three Iraqi patients have (16-20 years old) with three controls, a total sequenced for the *TREX1* coding region has hot spot for mutations. we could determined in (fig.5 red point with cycles) via (clone manager demo $_{9.2}$) software program .

DNA genome was isolated from blood serum with standard methods. The entire coding sequence of the mutable *TREX1* gene (400 -409 bp) is contained in one single exon 3 in chromosome 3. It was amplified in overlapping fragment and analyzed samples upon processed with the Sequencing of gene and performed by macrogen korea tools , Homology sequences was conducted using Basic Local Alignments Search Tool (BLAST) program which is available at the National Center Biotechnology Information (NCBI) online at (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov) and Bio Edit. Primer sequences and analysis conditions are available on appeal. The position of the detected variations is referred to the

sequence ( ID: NM_007248.5, ID: CAG33400.1 , ID: NM_007248.5) (fig.3A,4) from the NCBI public database. The detected missense variations were genotyped on three controls .

The fantastic functional rapport of the detected missense variations was assessed with the program To analyses the impact of equivalent variants on gene (Vaughn SE, *et al*.,2011, Pereira-Lopes S, *et al*. 2013) , we used NCBI analysis data (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) , which combines genetic data via (clone manager demo 9.2) software program .

One of them is a novel *TREX1* transition mutation (p.Val1032 Ale) identified in an first patient and it followed transversion mutation (p.Val1033 Ale) in second patient and missense mutations in this region (p.Tyr 859 Tyr and p.Val1031Ale) and also other regions at (p.Val1033 Ale) and (p.Val1032 Ale) of third patient (fig.3 B, 4) affected by the limits of disease. This substitution affects a conserved nucleotide in NCBI software analysis performed a potentially effect on protein folding (Fig3B). This position is not placed in a functional region but falls in the protein portion for one frameshift have been reported in SLE. The substitution affects the functional domain DNAseIII, and it is expected as damaging by NBCI analysis. Both in homozygous and in heterozygous form show to be sufficient are caused disruption DNAesIII and inhibiting *TREX1*$^{wt}$ DNA degradation(Hur JW, *et al*.,2008, Appenzeller S, *et al* ., 2008) .

Considering the physiological role of the *TREX1* protein, it is inviting to meditate that a disorder *TREX1* gene may result in the failure to degrade ssDNA or dsDNA leading to immune activation and development of autoantibodies against these macromolecules (Lee-Kirsch MA, *et al*.,2007).

| A: Score | Expect | Method | ID | Identities | Gaps | Strand | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **691 bits(766)** | **0.0** | **Compositional matrix adjust.** | **ID: NM_007248.5** | **386/388(99%)** | **0/388(0%)** | **Plus/Plus** | |
| **266 bits(680)** | **3e-90** | **Compositional matrix adjust.** | **ID: CAG33400.1** | **127/128(99%)** | **127/128(99%)** | **0/128(0%)** | **+3** |
| **676 bits(749)** | **0.0** | **Compositional matrix adjust.** | **ID: NM_007248.5** | **376/377(99%)** | **0/377(0%)** | **Plus/Plus** | |




**Figure (3) :- A : Sequenced lengths matching of mutable *TREX1* in SLE of Iraqi patients with NCBI databases mutable *TREX1* gene[Homo sapiens] ,**
**B: This substitution affects a conserved alignments of mutable *TREX1* gene of studying samples with nucleotide in NCBI software analysis performed a possible effect on protein folding (red point)**

| Samples No. | Type of substitution | Location | Nucleotide | Nucleotide change | Amino acid change | Predicted effect | Sequence ID | Score | Identities | Source |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Transition | 1032 | T>C | GTC>GCA | Valine> Alanine | Missense | ID: NM_007248.5 | 691 | 99% | Homo sapiens (TREX1) |
| | Transvertion | 1033 | C>A | GTC>GCA | Valine> Alanine | Missense | | | | |
| 2 | Transition | 859 | T>C | TAT>TAC | Tyrosine> Tyrosine | Nonsense | ID: NM_007248.5 | 676 | 99% | Homo sapiens (TREX1) |
| 3 | Transition | 859 | T>C | TAT>TAC | Tyrosine> Tyrosine | Nonsense | ID: NM_007248.5 | 682 | 99% | Homo sapiens (TREX1) |
| | Transvertion | 1031 | G>T | GTC>TCA | Valine> Serine | Missense | | | | |
| | Transition | 1032 | T>C | GTC>TCA | Valine> Serine | Missense | | | | |
| | Transvertion | 1033 | C>A | GTC>TCA | Valine> Serine | Missense | | | | |

**Figure (4 ): Nucleotide numbering of *TREX1* variations in three Iraqi patients with SLE reflects mutations types with +3 corresponding initiation codon in the GenBank reference sequence all the other variations were found only in heterozygosity.**




**Figure (5): Scheme of disease-associated *TREX1* mutations so far reported in literature to comparte alignment of DNA lengths of health *TERX1* gene (control) of DNAes III region 6150-6535 and other mutable *TREX1* gene in 3 patients, The mutation regions (red point) like missense mutations found in the present study are in cycles.**

## Discussion

Recently, A subsequent development, mutations in *TREX1* were described in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) malfunctioning of *TREX1* has shown correlations, heterozygous missense variant found an additional as alternative splicing results in multiple transcript variants.( Mazur DJ and Perrino FW. 2001)

The survey found that the disorder in a single *TREX1* allele which might be geminin with apoptosis enzymes causes death of healthy cells . (Lehtinen DA, *et al*., 2008)

However, our investigations raise the probability that defects in cellular pathways involving *TREX1* may give share to the lesions of common complex forms of systemic lupus erythematosus.

The homodimeric *TREX1* is the most copious intracellular DNase in mammalian cells. We have surly shown that *TREX1* plays a role in apoptotic single-stranded DNA damage induced by the killer lymphocyte protease and other apoptosis enzymes (Stetson DB, *et al*., 2008) .

Functional analysis has been outright some of these mutations In vitro have gotten like (p.Val1032Ale, p.Val1033Ale, and p.Tyr 859ATyr + p.Val1031Sre ) its becoming the connection between failure to degrade DNA by *TREX1* and immune response was first made in the *TREX1* null mammalian cells that have shown a dramatically reduced survival appealed with proliferated inflammatory . consciously, both mutations seem to be sufficient for abnormally in heterozygosity but a dominant negative effect can be hypothesized, since (De Vries B, *et al*.,2010) In fact, the previous results suggested that *TREX1* acts with a dominant negative effect, inhibiting *TREX1*$^{wt}$ DNA degradation in Systematic lupus erythematosus.

## References

Appenzeller S, Vasconcelos FA, Li LM, Costallat LT, Cendes F.2008" Quantitative magnetic resonance imaging analyses and clinical significance of hyperintense white matter lesions in systemic lupus erythematosus patients". Ann Neurol ;64:635–43.

B. de Vries, G. M. Steup-Beekman, J. Haan *et al*.2010 "*TREX1* gene variant in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus, "Annals of the Rheumatic Diseases, 69(10): 1886–1887.

B. Namjou, P. H. Kothari, J. A. Kelly *et al*.2011 "Evaluation of the *TREX1* gene in a large multi-ancestral lupus cohort," Genes and Immunity, 12( 4): 270–279.

Caza T, Oaks Z, Perl A.2014. Interplay of Infections, Autoimmunity, and Immunosuppression in Systemic Lupus Erythematosus. Int Rev Immunol .p. 1–34.

Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung JS, Demple B, Perrino FW, Lieberman J.2006" The exonuclease *TREX1* is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death" Mol Cell; 23:133–142.

Cooper GS, Parks CG, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, Cohen PL, *et al*.2002" Differences by race, sex and age in the clinical and immunologic features of recently diagnosed systemic lupus erythematosus patients in the southeastern United States". Lupus. 2(3):161–167.

D. Chowdhury, P. J. Beresford, P. Zhu *et al*.2006. "The exonuclease *TREX1* is in the SET complex and acts in concert with NM23- H1 to degrade DNA during granzyme a-mediated cell death," Molecular Cell, 23 (1): 133–142.

De Vries B, Steup-Beekman GM, Haan J, Bollen EL, Luyendijk J, Frants RR, *et al*.2010" *TREX1* gene variant in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus". Ann Rheum Dis; 12(4): 270–279.

G. Ramantani, J. Kohlhase, C. Hertzberg *et al*.2010 "Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in Aicardi-Goutieres syndrome," ` Arthritis & Rheumatism, 62(5): 1469–1477.

Hur JW, Sung YK, Shin HD, Park BL, Cheong HS, Bae SC.2008. *TREX1* polymorphisms associated with autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatol Int. ;28:783–789.

Karasinska, J. M. 2006." Searching for the Aicardi–Goutières syndrome genes: *TREX1* and ribonuclease H2 make the cut " *Clin. Genet.* 70, 457-46.

Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee YA, *et al*.2007. Mutations in the gene encoding the 3′-5′ DNA exonuclease *TREX1* are associated with systemic lupus erythematosus. Nat Genet. ;39:1065–1067.

Lehtinen DA, Harvey S, Mulcahy MJ, Hollis T, Perrino FW. 2008" The *TREX1* Double-stranded DNA Degradation Activity Is Defective in Dominant Mutations Associated with Autoimmune Disease". J Biol Chem. ;283:31649–56.

M. A. Lee-Kirsch, M. Gong, D. Chowdhury *et al*. 2007. "Mutations in the gene encoding the 3′-5′ DNA exonuclease *TREX1* are associated with systemic lupus erythematosus," Nature Genetics, 39( 9): 1065–1067.

M. Christmann, M. T. Tomicic, D. Aasland, N. Berdelle, and B. Kaina.2010 "Three prime exonuclease I *TREX1* is Fos/AP-1 regulated by genotoxic stress and protects against ultraviolet light and benzo(a)pyrene-induced dna damage," Nucleic Acids Research, 38 (19): 6418–6432.

M. Morita, G. Stamp, P. Robins *et al*. 2004. "Gene-targeted mice lacking the *TREX1* (DNase III) 3′→5′ DNA exonuclease developing inflammatory myocarditis," Molecular and Cellular Biology, 24( 15): 6719–6727.

Mazur DJ, Perrino FW. 2001."Structure and expression of the *TREX1* and *TREX2* 3′-5′ exonuclease genes". J. Biol Chem. ;276:14718–14727.

Pereira-Lopes S, *et al*. 2013." The exonuclease Trex1 restrains macrophage pro-inflammatory activation". J Immunol ;191(12):6128–6135.

Stetson DB, Ko JS, Heidmann T, Medzhitov R. 2008" *TREX1* prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity". Cell. ;134:587–598.

U. de Silva, S. Choudhury, S. L. Bailey, S. Harvey, F. W. Perrino, and T. Hollis,2007. "The crystal structure of *TREX1* explains the 3′nucleotide specificity and reveals a polyproline II helix for protein partnering," The Journal of Biological Chemistry, 282(14): 10537–10543.

Vaughn SE, Kottyan LC, Munroe ME, Harley JB.2011." Genetic susceptibility to lupus: the biological basis of genetic risk found in B cell signaling pathways". J. Leukoc Biol. 92(3): 577–591.

# Chemical composition of endemic *Origanum saccatum* plants grown naturally in Ermenek flora at different locations

Hasan Maral[1*], Saliha Kırıcı[2]

[*1]Karamanoğlu Mehmetbey University, Ermenek Vocational School, Department of Plant and Animal Production, Karaman, Turkey.
[2] Cukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Agronomy, Adana, Turkey.
*Corresponding author e-mail: hasmaral@kmu.edu.tr

**Abstract**

*Origanum* (*Lamiaceae*) is one of the high-value medicinal and aromatic plants used for various purposes in the field of food and health. The use of many species of this genus as raw materials in the medicinal herbs, spices, pharmaceuticals and cosmetics industries in world trade is important in local markets. Although the genus *Origanum* is strong aromatic plants, there is a high morphological and chemically diverse variety among the species of this genus. Its main chemical composition is phenolic components such as carvacrol, thymol, linalool and p-simene. *Origanum saccatum* is called as "Tahtacı Kekiği" in Alanya region around Antalya. It grows on the slopes at limestone rocks and the pine forests. It is endemic for C3 and C4 squares.

This study was carried out to determine the chemical composition of *Origanum saccatum* plants that were collected from 4 different altitudes (1196, 1323, 1449 and 1523 m) in Ermenek District of Karaman and cultured in 2 different locations (Adana and Ermenek). The experiment was conducted in Ermenek for 3 years in 2014, 2015 and 2016, and in the Research Field of Çukurova University Field Crops (Adana) for 2 years in 2015 and 2016. In the study, it was determined that the essential oil rates of the species collected from the flora varied between 0.24% and 0.48%, the essential oil rates of the species cultured in Adana varied between 0.10% and 0.76%, and the essential oil rates of the species cultured in Ermenek varied between 0.18% and 1.20%. The main components of the essential oils of the species collected from flora are carvacrol (21.23-58.80%), p-cymene (18.23-61.10%). In Adana, the main component is carvacrol (12.40-58.50%), p-cymene (21.10-58.20%), and in the culture cultivated in Ermenek, the main component is carvacrol (6.72-55.84%), p-cymene (12.69- 76.80).

**Keywords:** Ermenek, *Origanum saccatum*, endemic, essential oil, GC / MS, flora

## INTRODUCTION

Turkey is an important gene center of the *Lamiaceae* family, the number of species in the flora of our country according to the latest research in 9996, in terms of the number of taxa is 11707. The plants in Turkey Flora 3649 of them (31%) are endemic to (Güner ve ark., 2012; Şirin ve Ertuğrul 2015). Among the *Lamiaceae* species used in our country, the most well-known are the types known as “thyme”. When it is called “thyme” in the world, it is understood that plants containing essential oil and containing carvacrol and / or thymol as the main component in this essential oil. When evaluated in this regard, we see that plants of different genera and species belonging to different families are called and used as thyme. Belonging to *Lamiaceae* family as five different species of thyme in different localities in Turkey (*Origanum, Thymus, Thymbra, Satureja, Coridothymus*) the species are used (Karık et al., 2014; Maral and Kırıcı 2018).

The common features of these genus are that the main components of essential oils are usually carvacrol or thymol or both. Where 23 types of *Origanum* eight sections distributed in Turkey, 14 of which is said to be endemic; natural hybrids are also found in the regions where it has been identified as sympathetic (the process by which new species from a single ancestral species live in the same geographical area evolved); hybrids have been reported to show a wide variation in themselves, especially in terms of floral properties. Thyme is classified as essential oil plant according to the active ingredient it contains and as a spice plant according to consumption and usage (Ceylan, 1995). According to the plant organs utilized, it is included in the group of spice plants using herbas (Herba Origani) and leaves (Folia Origani) (Baytop, 1999; Zeybek ve Zeybek, 2002).. It is also widely used as thyme oil (Oleum Origani) (Baytop, 1999). *Origanum saccatum* is called as "Tahtacı

Kekiği" in Alanya region around Antalya. It grows on the slopes at limestone rocks and the pine forests. It is endemic for C3 and C4 squares (Demirezer, 1985).

Karaman Ermenek District, both geographical and floristic both in terms of climate, Central Anatolia - is presented in the passage between the Mediterranean Regions, Davis (1982) enters the C4 frame according to his grid system for Turkey. Ermenek contains numerous habitats with different characteristics ranging from bare rocks and debris to abundant humus forest areas. Considering the fact that Central Anatolia and Mediterranean climates meet on these habitats, the diversity in the vegetation of the region is understood automatically. When we look at the analysis of the flora of the region, the fact that the ratio of Iran-Turan (21.20%) and Mediterranean (20.45%) elements is very close to each other can be considered as a result of this transition situation. *Thymus* ssp., *Origanum* ssp., *Satureja* ssp., *Salvia* ssp., *Rhus coriaria* species are collected and evaluated by local people (Davis, 1982; TUBIVES, 2011; Maral et al., 2018a). The essential oil production does not depend only on plant genetics or developmental stage. The environment and its changes can influence in a significant way biochemical pathways and physiological processes that alter plant metabolism and, therefore, the essential oil biosynthesis (Barakat et al., 2013). For these reasons essential oil content and composition are very changeably according to temperature of seasonally and daily.

This study was carried out to determine the chemical composition of *Origanum saccatum* plants that were collected from 4 different altitudes in Ermenek District of Karaman and cultured in 2 different locations.

## MATERIALS AND METHODS

The materials of the research consisted of plants collected from the Natural Flora in Ermenek District of Karaman and cultivated. The areas where plants are collected; Coordinates, location, collecting date and altitude are given in Table 1.

**Table 1.** Turkish Name, Collection Place, Date, Height and Coordinates of Origanum saccatum Plant Collected from Natural Flora

| Species Number | Turkish Name | Collection Place | Collecting Date | Altitutes | Coordinates |
|---|---|---|---|---|---|
| 10 | Tahtacı Kekiği | Tuz Taşı | 16.07.2012 | 1449 | 36.638324, 32.970037 |
| 33 | | Sarı Vadi | 21.07.2012 | 1323 | 36.546118, 32.841956 |
| 40 | | Ermenek | 23.07.2012 | 1523 | 36.628961, 32.918587 |
| 49 | | Cenne Köyü | 28.07.2012 | 1196 | 36.615265, 32.785533 |

### Climatic Properties of Ermenek Trial Area

Climate data for the 2014, 2015 and 2016 years of the trial are given in Table 2. In general, the Ermenek climate belongs to the subtype of Mediterranean influenced climates (Mediterranean transitional climate). Taurus Mountain system followed by hot character, dry summers in the arid winters is a type of climate. The average annual temperature is between 0.5-24.6 oC. The hottest month is August. The coldest month is January. In these high mountains and highlands, summers pass through the wetlands in the valleys of Göksu although they are short and cool. The average annual rainfall is 564 mm.

**Table 2.** Some Important Climate Data on the 2014, 2015 and 2016 Average of the Trial in Ermenek

| | Years | Temperature (°C) | | | Rainfall (mm) | Relative Humidity (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Min. | Max. | Average | | |
| January | 2014 | 0.7 | 9.7 | 4.8 | 71.8 | 63.7 |
| | 2015 | -1.8 | 6.2 | 1.8 | 25.6 | 69.5 |
| | 2016 | -3.2 | 5.0 | 0.5 | 78.3 | 68.5 |
| February | 2014 | 0.6 | 11.0 | 5.4 | 9.7 | 51.7 |
| | 2015 | -1.2 | 6.4 | 2.0 | 108.2 | 73.4 |
| | 2016 | 1.9 | 12.0 | 6.5 | 22.9 | 63.8 |
| March | 2014 | 2.6 | 13.2 | 7.5 | 15.9 | 53.9 |
| | 2015 | 1.7 | 11.5 | 6.0 | 77.6 | 63.7 |
| | 2016 | 2.2 | 13.1 | 7.2 | 53.5 | 53.8 |
| April | 2014 | 6.2 | 18.0 | 11.6 | 15.6 | 51.2 |
| | 2015 | 3.4 | 14.8 | 8.7 | 2.9 | 52.5 |
| | 2016 | 8.6 | 20.1 | 14.0 | 20.6 | 40.8 |
| May | 2014 | 9.6 | 21.1 | 14.6 | 82.8 | 58.3 |
| | 2015 | 10.0 | 22.0 | 15.7 | 17.4 | 47.5 |
| | 2016 | 9.3 | 20.9 | 14.5 | 63.3 | 53.8 |
| June | 2014 | 13.1 | 25.6 | 19.0 | 35.5 | 50.9 |
| | 2015 | 12.1 | 24.4 | 17.9 | 38.5 | 55.2 |
| | 2016 | 15.2 | 27.6 | 21.2 | 5.5 | 39.5 |
| July | 2014 | 17.5 | 30.8 | 23.8 | 14.6 | 38.9 |
| | 2015 | 16.5 | 29.6 | 23.0 | 2.2 | 36.8 |
| | 2016 | 18.5 | 31.0 | 24.5 | 0.0 | 32.2 |
| August | 2014 | 18.7 | 31.6 | 24.6 | 5.0 | 38.0 |
| | 2015 | 17.1 | 30.5 | 23.4 | 29.6 | 43.1 |
| | 2016 | 18.0 | 31.7 | 24.6 | 2.1 | 32.9 |
| September | 2014 | 13.3 | 25.4 | 18.6 | 9.6 | 41.0 |
| | 2015 | 16.2 | 29.1 | 22.3 | 4.2 | 53.7 |
| | 2016 | 12.8 | 25.8 | 19.9 | 7.4 | 38.6 |
| October | 2014 | 8.5 | 19.1 | 13.1 | 48.7 | 40.5 |
| | 2015 | 10.5 | 20.7 | 15.1 | 48.1 | 59.1 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2016 | 9.9 | 22.4 | 13.4 | 7.2 | 55.0 |
| November | 2014 | 2.9 | 12.7 | 7.2 | 55.2 | 57.3 |
| | 2015 | 4.8 | 15.3 | 9.7 | 11.8 | 58.8 |
| | 2016 | 3.1 | 14.8 | 9.0 | 37.5 | 46.5 |
| December | 2014 | 2.7 | 10.1 | 6.0 | 66.7 | 51.9 |
| | 2015 | -0.5 | 9.5 | 4.1 | 9.6 | 73.7 |
| | 2016 | -3.7 | 5.1 | 4.0 | 172.4 | 48.0 |

Source: Regional Directorate of State Meteorology

**Soil Properties of the Experimental Area in Ermenek**

Some physical and chemical properties of soils in the area where the experiment is carried out are given in Table 3. The soil pH (7.56) in the area where the experiment was established generally shows neutral characteristics. The salt content is 0.17%, available $P_2O_5$ is 5.9 ppm.

**Table 3.** Some Physical and Chemical Properties of Ermenek Site

| Depth (cm) | Texture | | | pH | Salt | Lime | $P_2O_5$ | $K_2O$ | Fe | Zn | Mn | Cu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sand (%) | Plate (%) | Clay (%) | | | % | kg/da | | mg/kg | | | |
| 0-30 | 46,0 | 25,5 | 28,5 | 7,56 | 0,17 | 63,1 | 5,9 | | 3,3 | 0,6 | 2,2 | 0,8 |

**Climate Characteristics of the Trial Area in Adana**

In the Adana province where the trial was conducted, the winters are warm and rainy, and the hot and arid Mediterranean climate prevails in summer. Climate data for the 2015, 2016 and long years average of the experiment are given in Table 4. In 2015 and 2016, the temperature values were consistent with the averages for many years but were generally above the averages. The highest precipitation was in December 2016 with 216.3 mm.

**Table 4**. Some Important Climate Data on the 2015, 2016 and Long Years Average of the Trial in Adana

| | Years | Temperature (°C) | | | rainfall (mm) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Min | Max. | Average | |
| January | long years | 5.5 | 15.0 | 9.6 | 109.9 |
| | 2015 | 5.9 | 14.5 | 9.4 | 107.5 |
| | 2016 | 5.3 | 13.4 | 8.7 | 138.4 |
| February | long years | 6.1 | 16.2 | 10.5 | 84.2 |
| | 2015 | 7.7 | 16.2 | 11.1 | 122.0 |
| | 2016 | 9.5 | 20.5 | 13.9 | 83.1 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| March | long years | 8.5 | 19.5 | 13.5 | 66.8 |
| | 2015 | 9.9 | 20.7 | 14.5 | 135.1 |
| | 2016 | 11.2 | 21.7 | 15.7 | 67.1 |
| April | long years | 12.2 | 23.8 | 17.5 | 55.2 |
| | 2015 | 11.7 | 22.8 | 16.9 | 21.5 |
| | 2016 | 14.6 | 27.5 | 20.5 | 36.6 |
| May | long years | 15.9 | 28.2 | 21.7 | 47.3 |
| | 2015 | 17.3 | 28.7 | 22.5 | 65.7 |
| | 2016 | 17.2 | 27.1 | 21.6 | 87.9 |
| June | long years | 20.0 | 31.7 | 25.6 | 20.0 |
| | 2015 | 20.9 | 29.8 | 25.0 | 4.8 |
| | 2016 | 22.2 | 32.5 | 27.1 | 45.6 |
| July | long years | 23.2 | 33.8 | 28.1 | 7.1 |
| | 2015 | 24.4 | 33.9 | 28.5 | 0.40 |
| | 2016 | 25.4 | 35.0 | 29.6 | 0.20 |
| August | long years | 23.5 | 34.6 | 28.4 | 5.2 |
| | 2015 | 25.6 | 35.8 | 30.0 | 10.9 |
| | 2016 | 25.6 | 35.8 | 29.9 | 4.4 |
| September | long years | 20.3 | 33.1 | 25.9 | 15.8 |
| | 2015 | 23.1 | 34.8 | 28.4 | 130.0 |
| | 2016 | 21.1 | 32.8 | 26.3 | 39.8 |
| October | long years | 15.9 | 29.0 | 21.3 | 40.7 |
| | 2015 | 18.7 | 29.4 | 23.4 | 32.1 |
| | 2016 | 17.7 | 30.3 | 23.1 | 0.0 |
| November | long years | 10.7 | 22.4 | 15.4 | 73.7 |
| | 2015 | 12.5 | 24.6 | 17.5 | 10.5 |
| | 2016 | 10.3 | 23.2 | 15.6 | 11.9 |
| December | long years | 7.1 | 16.8 | 11.2 | 128.7 |
| | 2015 | 7.0 | 18.8 | 11.8 | 0.6 |
| | 2016 | 5.3 | 14.0 | 9.0 | 216.3 |

Source: Regional Directorate of State Meteorology

**Soil Properties of the Trial Area in Adana**

The area of the trial area is the enticolites formed by very young aluvial deposits brought by the Seyhan River side rivers. Her breathing is moderate to profound. There are only A and C horizons. The territory where the experiment is established is usually Tınlı. Some physical and chemical properties of soils in the area where the experiment is carried out are given in Table 5.

**Table 5.** Some Physical and Chemical Properties of Experimental Ground Soils

| Depth (cm) | pH | Salt (%) | $P_2O_5$ 1-) | KDK | $K_2$ -) | N 3-) | lime (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0-20 | 7.29 | 0.055 | 14.17 | 30.40 | 900 | 0.112 | 33.02 |
| 20-40 | 7.28 | 0.060 | 3.42 | 29.30 | 800 | 0.056 | 35.28 |
| 40-60 | 7.29 | 0.052 | 2.43 | 34.78 | 850 | 0.056 | 40.52 |

1-) Extension of NaHCO3

2-) Extension of HNO3

3-) Total nitrogen determined by Kjeldahl method

**Experiment and Cultural Processes**

In the summer period of March and April of 2014, steel was taken from the previously determined species. Plants rooted in viols are surprised at the trial land in Adana and Ermenek. During the research, weed control in the experiment was provided by mechanical methods. Plants in the Ermenek trial area were harvested in the flowering period in 2014, 2015 and 2016. Plants in the Adana trial area were harvested in the flowering period in 2015 and 2016 as there was no bloom due to late planting in 2014. Planting and harvesting dates of the plants are given in Table 6.

**Table 6.** Planting and Harvest Dates of Plants Cultured in Ermenek and Adana

| No | Ermenek | | | | Adana | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Planting Date | Harvest Date | | | Planting Date | Harvest Date | |
| | | 2014 | 2015 | 2016 | | 2015 | 2016 |
| 10 | **14.04.2014** | 14.06 | 03.07 | 27.06 | **23.06.2014** | 14.06 | 08.06 |
| 33 | | 20.06 | 01.07 | 27.06 | | 20.06 | 11.06 |
| 40 | | 18.06 | 03.07 | 30.07 | | 18.06 | 08.06 |
| 49 | | 15.06 | 02.07 | 27.06 | | 15.06 | 08.06 |

**Essential Oil Percentage (%):** 25 g dry leaf samples from plants were converted to% (ml / 100 g) after determining the essential oil ratio in the Clevenger apparatus by water vapor distillation method.

**Essential Oil Components:**

Analysis of the essential oils carried out by using Thermo Scientific Focus Gas Chromatograph equipped with MS, auto sampler and TR-5MS (5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane, 0.25 mm x 30 m i.d, film thickness 0.25). The carrier gas was helium (99.9%) at a flow rate of 1 mL min-1; ionization energy was 70 eV. Mass range m/z 50-650 amu. Data acquisition was scan mode. MS transfer line temperature was 250 °C, MS Ionization source temperature was 220 °C, the injection port temperature was 220 °C. The samples were injected with 250 split ratio. The injection volume was 1 µl. Oven temperature was programmed in the range of 50 to 220 °C at 3 °C min-1. The structure of each compound was identified by comparison with their mass spectrum (Wiley9). The data were handled using Xcalibur software program. The retention indices (RIs) were calculated for all volatile constituents using a homologous series of n-alkane standard solutions C8-C20 (Fluka, product no. 04070) and C21-C40 (Fluka, product no. 04071).

## RESULTS and DISCUSSION

### Essential Oil Components of Plants Collected from Flora

The essential oil ratio in the origanum saccatum plant varied between 0.24% and 0.48%. The highest value was obtained from sample 40, which was collected from 1553 m elevation in the center of Ermenek with 0.48%, while the smallest value was obtained from samples 10 and 49 with 0.24%. Essential oil ratios were not affected by the altitudes difference (Table 7).

Özcan and Chalchat (2009) stated that *O. saccatum* essential oil was 0.80%. The essential oil rate we obtained is slightly lower than the literature. It has been reported by many researchers that the essential oil rate and content of *Origanum* species collected from nature vary widely (Barata et al. 1998: Başer et al. 2003: Özcan and Chalchat 2009: Maral et al., 2018b).

GC-MS analyzes were carried out to determine the components of essential oils obtained from plants collected from nature. The results of essential oil ratios and components obtained from these examples are given in Table 7. When looking at the essential oil components of *Origanum saccatum* samples collected from four different heights; In example 10, the main component was 52.99% carvacrol, followed by p-cymene with 18.23% and γ-terpinene with 17.52%.The main components for example 33 were 46.12% p-cymene, 22.38% carvacrol and 6.39% ter-terpinene. In Example 40, the main components were 61.10% p-cymene, 21.23% carvacrol and 4.29% isoborneol. In example 49, it was determined that 58.80% carvacrol, 27.04% p-cymene and 4.28% γ-terpinene (Table 7).

Tümen et al. (1994) reported that 83.75% p-cymene is present in *Origanum saccatum* essential oil. Sözmen et al. (2011) reported the main components as 72.5% p-cymene, 9.32% thymol and 7.18% carvacrol in their study on Origanum saccatum. Figuérédo et al. (2006), in their study, reported that *Origanum saccatum* essential oil has 73.6% p-cymene, 3.9% α-terpineol, 3.8% carvacrol and 1.4% terpinen-4-ol. In their study, Özcan and Chalchat (2009) reported that *Origanum saccatum* essential oil has 82.80% p-cymene, 6.23% α-terpinene, 1.20% carvacrol. Turgut and Tuğrul Ay (2009) reported in their study that the main component of *Origanum saccatum* essential oil is 34.20% carvacrol. According to the results we obtained in our study, samples 10 and 49 indicate that the main component is carvacrol in their study, and Turgut and Tuğrul Ay (2009), while samples 33 and 40 indicate the main component as p-cymene. (1994), Figuérédo et al. (2006), Özcan and Chalchat (2009), Sözmen et al. (2011) showed a parallel with.

**Table 7.** Essential Oil Rates and Components of *O. saccatum* Species Collected from Flora (%)

| | Essential Oil Rates | 0.24 | 0.40 | 0.48 | 0.24 |
|---|---|---|---|---|---|
| | Altitudes (m) | 1449<br>10 | 1323<br>33 | 1523<br>40 | 1196<br>49 |
| RT | Compounds | | | | |
| 3.41 | α-Pinene | 0.59 | 0.97 | 1.19 | 0.67 |
| 3.47 | α-phellandrene | 0.77 | 0.61 | 0.32 | 0.48 |
| 4.04 | Camphene | 0.88 | 3.10 | 3.50 | 1.12 |
| 4.76 | β-Pinene | 0.10 | 0.16 | 0.18 | 0.33 |
| 6.01 | Myrcene | 0.86 | 0.35 | 0.14 | 0.41 |
| 6.36 | α-Terpinene | 1.66 | 1.03 | - | - |
| 6.85 | D-Limonene | 0.21 | 0.45 | 0.45 | 0.14 |
| 7.04 | Eucalyptol | 0.23 | 0.26 | 0.12 | - |
| 7.09 | β-phellandrene | 0.14 | 0.17 | - | - |
| **8.17** | **γ-terpineene** | **17.52** | **6.39** | 1.91 | **4.28** |
| **8.96** | **P-p-cymene** | **18.23** | **46.12** | **61.10** | **27.04** |
| 15.76 | trans Sabinene hydrate | - | - | 0.26 | 0.16 |
| 17.34 | Camphor | - | 0.21 | 0.32 | - |
| 18.85 | 4-Thujanol | - | 0.49 | 0.30 | 0.12 |
| **19.07** | **Linalool** | 0.55 | 0.16 | 0.11 | 1.01 |
| 20.31 | Caryophyllene | 0.97 | 1.94 | 1.16 | 0.82 |
| 20.65 | Alloaromadendrene | 0.17 | 0.21 | 0.11 | - |
| 20.83 | 4-Terpeneol | 0.34 | 0.76 | 0.25 | 0.34 |
| 23.61 | Thymol methyl ether | 0.14 | 0.13 | 0.19 | - |
| 25.29 | Isoborneol | 1.62 | 4.81 | **4.29** | 2.60 |
| 26.75 | Farnesol | 0.59 | 2.42 | - | - |
| 33.67 | Caryophylleneoxide | - | 0.79 | 1.01 | 0.25 |
| 38.46 | Spathulenol | 0.20 | 0.56 | 0.74 | - |
| 40.80 | Thymol | 0.22 | 3.21 | - | - |
| **40.79** | **Carvacrol** | **52.99** | **22.38** | **21.23** | **58.80** |
| | Total (%) | 98.98 | 97.68 | 98.88 | 98.57 |
| | Component Number | 21 | 24 | 21 | 16 |

**Essential Oil Rate in Planted Origanum saccatum**

In the research, the essential oil rate (%) of the endemic *Origanum saccatum* plants collected from flora and cultured in Ermenek District of Karaman and Adana are given in Table 8.

**Plants Cultured in Ermenek;** For sample 10, the essential oil rate was determined as 0.18% in the first year, 0.36% in the second year and 0.24% in the third year.
The essential oil rate of sample 33 was measured as 0.81% in the first year and 1.20% in the second year and 0.40% in the third year.
The essential oil rate of sample 40 was found to be 0.30% in the first year, 0.80% in the second year and 0.48% in the third year.
The essential oil rate of the 49th sample was 0.18% in the 1st year, 0.13% in the 2nd year and 0.24% in the 3rd year.

The average 3-year essential oil rate varied between 0.18% and 0.80%. The highest essential oil rate was taken in sample 33 with 0.80%, followed by sample 40 with 0.52%. The lowest essential oil rate was obtained in example 49 with 0.18% (Table 8). Compared with its natural form, it is seen that the upper value is higher than the natural form.

**Plants Cultured in Adana;** For sample 10, the essential oil rate was determined as 0.18% in the first year and 0.44% in the second year.
The essential oil rate for sample 33 was measured as 0.58% in the first year and 0.76% in the second year.

The essential oil rate for sample 40 was found to be 0.12% in the first year and 0.26% in the second year. The essential oil rate for sample 49 was 0.10% in the first year and 0.32% in the second year.

The average 2-year essential oil rate in Adana ranged from 0.19% to 0.67%. The highest essential oil rate was taken in sample 33 with 0.67%, followed by sample 10 with 0.31%. The lowest essential oil rate was obtained in example 40 with 0.19% (Table 8). Compared to its natural form, it is seen to be higher than the natural form. When the locations are compared in terms of average essential oil rate; Samples 33 and 40 reached higher levels of essential oil in Ermenek and samples 10 and 49 in Adana.

Tümen et al. (1994) reported *Origanum saccatum* essential oil rate as 0.83%. Özcan and Chalchat (2009) reported the essential oil rate of *Origanum saccatum* as 0.80% in their study. The essential oil rates we obtained were lower than the above studies. It is known that the rate and composition of essential oil, which is one of the important secondary metabolites of medicinal plants, is under the influence of the plant's genotype, the climate and soil conditions of the culture and the cultivation practices (Antal et al., 2012; Baydar, 2013; Mammadov, 2014).

**Table 8.** Average Essential Oil Rate of Origanum saccatum Plants in Ermenek and Adana (%)

| Species | Ermenek | | | | Adana | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number | **2014** | **2015** | **2016** | **Average** | **2015** | **2016** | **Average** |
| **10** | 0.18 | 0.36 | 0.24 | **0.26** | 0.18 | 0.44 | **0.31** |
| **33** | 0. 81 | 1.20 | 0.40 | **0.80** | 0.58 | 0.76 | **0.67** |
| **40** | 0.30 | 0.80 | 0.48 | **0.52** | 0.12 | 0.26 | **0.19** |
| **49** | 0.18 | 0.13 | 0.24 | **0.18** | 0.10 | 0.32 | **0.21** |
| **Average** | **0.36** | **0.62** | **0.34** | **0.44** | **0.24** | **0.44** | **0.34** |

**Essential Oil Components in Planted Origanum saccatum**

The values of the essential oil components (%) of the endemic *Origanum saccatum* samples collected from flora and cultured in Ermenek District of Karaman are given in Table 9.

When looking at the essential oil components of sample 10, the first year was carvacrol with 44.57% as the main component, followed by p-cymene with 34.99%, γ-terpinene with 4.70% and linalool with 4.68%.The second year was the highest rate of carvacrol with 51.56%, γ-terpinene with 15.42%, p-cymene with 14.90% and isoborneol with 2.55%.In the third year, the high value was p-cymene with 58.87%, followed by carvacrol with 12.39%, γ-terpinene with 7.79% and isoborneol with 7.09%. Compared to its natural form in terms of main components; In terms of the ratio of carvacrol, the natural form is parallel with the 1st and 2nd years, while the 3rd year has a lower rate of carvacrol. The increase in P-cymene ratio in the 1st and 3rd years was similar in the 2nd year.

For sample 33, essential oil components were the highest in the first year as carvacrol, p-cymene, γ-terpinene and isoborneol (32.57%, 27.30%, 4.91% and 4.72%), while the second year carvacrol ratio was 55.84%, p- cymene ratio was 12.69%, γ-terpinene ratio was 7.96%, α-Methylcyclopentanone ratio was 4.35%, linalool ratio was 3.37% and isoborneol ratio was 3.21%.In the third year, the main components were p-cymene 46.76%, carvacrol 18.21%, γ-terpinene 9.69%, isoborneol 5.61% and α-Methylcyclopentanone 4.70%. Compared to its natural form, it is seen that the rate of carvacrol is higher in the 1st and 2nd years compared to the natural form and lower in the 3rd year. Contrary to carvacrol ratio, P-cymene ratio decreased in 1st and 2nd years and increased in 3rd year.

In the essential oil of the 40th example, the first year was the p-cymene with 48.38%, carvacrol with 19.92%, γ-terpinene with 12.32% and isoborneol with 4.00%.In the 2nd year, the rate of p-cymene was 32.14%, carvacrol ratio was 30.82%, α-Methylcyclopentanone ratio was 7.35% and γ-terpinene ratio was 5.31%.In the 3rd year, the main components were p-cymene, carvacrol, γ-terpinene, α-Methylcyclopentanone, isoborneol and linalool (38.59%, 24.27%, 7.47%, 7.33%, 5.65% and 4.64%) respectively. Compared to its natural form, it is seen that carvacrol ratio has close values, decreases in p-cymene ratios and increases in γ-terpinene ratios.

For sample 49, essential oil components were the first year with the highest rate of p-cymene, carvacrol, γ-terpinene, camphene and isoborneol (41.97%, 20.24%, 13.13%, 4.07% and 3.91%) respectively. In the second year, the rates of main components were carvacrol 38.29%, p-cymene 24.70%, γ-terpinene 12.20% α-Methylcyclopentanone 4.57% and isoborneol ratio 3.04%.In the third year, the main components

were p-cymene 76.80%, γ-terpinene 7.12%, carvacrol 6.72% and isoborneol 1.93%. Compared to its natural form, it is seen that the rate of carvacrol is lower compared to the natural form, while the ratio of P-cymene and γ-terpinene increases.

**Table 9.** Essential Oil Components of *Origanum saccatum* Plants Planted in Ermenek for 2014, 2015 and 2016

| RT | Years | 2014 | | | | 2015 | | | | 2016 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Altitudes (m) | 1449 10 | 1323 3 | 1523 0 | 1196 9 | 1449 10 | 1323 3 | 1523 0 | 1196 9 | 1449 10 | 1323 3 | 1523 0 | 1196 9 |
| | Compounds | | | | | | | | | | | | |
| 3.4 | α-Pinene | 0.72 | 0.80 | 1.28 | 1.77 | 0.71 | 0.37 | 2.11 | 2.08 | 1.17 | 0.67 | 0.44 | 0.55 |
| 3.46 | α-phellandrene | 0.56 | 0.50 | 1.01 | 1.12 | 0.80 | 0.57 | 2.77 | 0.85 | 0.35 | 0.48 | 1.34 | 0.30 |
| 4.03 | Camphene | 1.76 | 2.83 | 2.95 | 4.07 | 1.11 | 4.02 | 4.80 | 2.02 | 1.85 | 3.41 | 2.96 | 2.21 |
| 4.74 | β-Pinene | 0.50 | 2.35 | 1.16 | 1.18 | 1.12 | 2.92 | 1.32 | 0.27 | 0.56 | 1.92 | 1.50 | 0.32 |
| 6.35 | α-Terpinene | 0.97 | 1.14 | 1.78 | 1.86 | 1.84 | 1.95 | 1.35 | 1.17 | 0.60 | 1.12 | 0.49 | 0.59 |
| 6.83 | D-Limonene | 0.19 | - | 0.37 | 0.80 | 0.58 | 0.98 | 0.63 | 0,21 | 1.12 | 0.16 | - | 0.20 |
| 8.16 | γ-terpinene | 4.70 | 4.91 | 12.3 | 13.1 | 15.4 | 7.96 | 5.31 | 12.2 | 7.79 | 9.69 | 7.47 | 7.12 |
| **8.9** | **P-cymene** | **34.9** | **27.3** | **48.3** | **41.9** | **14.9** | **12.6** | **32.1** | **24.7** | **58.8** | **46.7** | **38.5** | **76.8** |
| 9.54 | α-Methylcyclop | - | 2.14 | 0.12 | 0.25 | 3.21 | **4.35** | **7.35** | **4.57** | - | **4.70** | **7.33** | 0.31 |
| 15.7 | 4-Thujanol | - | - | - | 0.21 | - | - | 0.55 | 0.33 | 0.30 | 0.60 | 1.15 | 0.26 |
| 17.3 | Camphor | - | 0.23 | 0.16 | 0.16 | - | - | 1.21 | 3.71 | 0.64 | 0.30 | 0.65 | 0.16 |
| 19.0 | Linalool | 4.68 | 0.37 | 0.15 | 0.17 | 0.91 | 3.37 | 0.62 | 0.33 | 1.49 | 1.32 | 4.64 | 0.12 |
| 20.2 | Caryophyllene | 0.62 | 2.18 | 2.13 | 3.13 | 1.28 | - | 3.80 | 1.19 | 1.11 | 1.72 | 0.87 | 0.29 |
| 20.8 | 4-Terpeneol | 0.56 | 0.51 | 0.61 | 0.54 | 0.50 | 0.56 | 0.63 | 0,65 | 0.44 | 0.65 | 0.62 | - |
| 24.4 | Isoborneol | 3.44 | 4.72 | 4.00 | 3.91 | 2.55 | 3.21 | 0.63 | 3.04 | 7.09 | 5.61 | 5.65 | 1.93 |
| 25.2 | cis-Farnesol | 0.28 | 1.50 | 1.04 | 1.35 | 0.80 | - | - | 1,02 | 0.41 | - | - | 0.17 |
| 33.6 | Caryophyllene oxide | 0.20 | 3.17 | 0.28 | 1.69 | 0.16 | 0.29 | 0.44 | 1,33 | 1.18 | 0.17 | 0.76 | 0.34 |
| 38.4 | Spathulenol | 0.19 | 1.23 | 0.33 | 0.59 | - | - | 0.49 | 0,28 | 0.20 | - | - | 0.32 |
| **40.7** | **Thymol** | - | **7.56** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **41.6** | **Carvacrol** | **44.5** | **32.5** | **19.9** | **20.2** | **51.2** | **55.8** | **30.8** | **38.2** | **12.3** | **18.2** | **24.2** | **6.72** |
| Total (%) | | 99.1 | 98.2 | 98.9 | 99.1 | 97.1 | 99.0 | 98.9 | 98.4 | 98.7 | 98.4 | 98.7 | 99.0 |
| Component Number | | 17 | 19 | 21 | 22 | 16 | 14 | 20 | 20 | 21 | 19 | 16 | 20 |

Values for essential oil components of *Origanum saccatum* samples collected from flora and cultured in Adana are given in Table 10.

When looking at the oil content of sample 10, the first year was carvacrol with 33.80% as the main component, followed by p-cymene with 21.38%, isoborneol with 7.01%, and α-Pinene with 6.36%.In the 2nd year, the highest rate was p-cymene with 42.66%, carvacrol with 23.27%, 10-terpinene with 11.10% and isoborneol with 9.45%. Compared to its natural form in terms of main components; It was observed that the ratio of carvacrol and γ-terpinene decreased and the rate of p-cymene increased.

For sample 33, the essential oil components were 1st year with the highest rate of carvacrol, p-cymene, γ-terpinene and isoborneol (58.55%, 21.18%, 5.42% and 2.22%), while 2nd year p-cymene ratio was 58.25%, carvacrol ratio was 15.21%, γ-terpinene ratio was 13.54%, isoborneol ratio was 4.12% and camphene ratio was 2.06%. Compared with its natural form, carvacrol ratio is higher in the first year compared to the natural form and lower in the second year. In contrast to the carvacrol ratio, the P-cymene ratio decreased in the first year and increased in the second year.

For example 40, in the first year, the main components were p-cymene with 44.65%, carvacrol with 20.89%, isoborneol with 8.93%, linalool with 5.75% and γ-terpinene with 5.23%.In the 2nd year, the rate of p-cymene was 53.62%, carvacrol rate was 12.46%, γ-terpinene ratio was 11.46% and isoborneol ratio was 6.79%. Compared to its natural form, it is seen that the rate of carvacrol has close values in the first year and decreased in the second year. There was a decrease in p-cymene ratio and an increase in γ-terpinene ratio.

For sample 49, the essential oil components were 1 year in the highest rate of carvacrol, p-cymene, thymol, isoborneol and ve-terpinene (43.69%, 33.94%, 7.0%, 3.99% and 2.18%).In the 2nd year, the rates of main components were p-cymene 40.80%, carvacrol 21.95%, γ-terpinene 18.04% and isoborneol 4.58%.Compared to its natural form, it is seen that the carvacrol ratio remains lower than the natural form and the ratio of P-cymene and γ-terpinene increases.

Looking at the previous studies; The essential oil rate and content of *Origanum* species collected in nature have been reported to vary widely (Barata et al. 1998: Başer et al. 2003: Özcan and Chalchat 2009). Tümen et al. (1994) reported that 83.75% p-cymene is present in *Origanum saccatum* essential oil. Sözmen et al. (2011) reported the main components as p-cymene 72.5%, thymol 9.32% and carvacrol 7.18% in their study on *Origanum saccatum*. Figuérédo et al. (2006) reported that in their study with 7 *Origanum* species, *Origanum saccatum* essential oil was 73.6% p-cymene, 3.9% α-terpineol, 3.8% carvacrol and 1.4% terpinen-4-ol. In their study, Özcan and Chalchat (2009) reported that *Origanum saccatum* essential oil has 82.80% p-cymene, 6.23% ter-terpinene, 1.50% p-cymen-8-ol and 1.20% carvacrol. Turgut and Tuğrul Ay (2009) reported in their study that the main component of *Origanum saccatum* essential oil is 34.20% carvacrol.

There are certain differences between carvacrol and thymol, which are generally phenolic compounds, and their hydrocarbonic precursors, terpinen and p-cymene. In hot weather, phenolic compounds rise to the detriment of their precursors. This can be explained by the influence of environmental factors. Because these plants grow at higher temperatures in summer compared to spring. These conditions accelerate the transformation of terpinene and p-cymene components into phenolic components. This observation shows that terpinene and p-cymene components are biogenetic precursors of thymol and carvacrol. It has also been reported that there is a negative relationship between γ-terpinene and carvacrol (Said-Al Ahl et al., 2009).

According to the results we obtained in our study in Ermenek; Samples 10 and 33 were compatible with Turgut and Tuğrul Ay (2009), while samples 40 and 49 were compatible with other studies above.

According to the results we obtained in our study in Adana; Samples 10, 33 and 49 were compatible with Turgut and Tuğrul Ay (2009), while sample 40 was compatible with other studies above.

## CONCLUSION

When the samples taken to culture in Ermenek in terms of the main components of essential oil are examined; The main component of samples 10 and 33 came to the fore as carvacrol in 2014 and 2015 and P-cymene in 2016. The main component of sample 40 has become prominent as P-cymene every three years. P-cymene became the main component of sample 49 in 2014 and 2016 as carvacrol in 2015.

When the samples taken in Adana in terms of the main components of the essential oil are examined; The main component of sample 10 came to the fore as γ-terpinene in 2015 and P-cymene in 2016. The main component of samples 33 and 49 became carvacrol in 2015 and P-cymene in 2016. The main component of sample 40 came to the fore in both years P-cymene.

As a result, sample 40 drew a homogeneous image at both locations. Variations were observed in the main components of samples 10, 33 and 49.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Çukurova University Scientific Research Projects Number: 2F2011020 for supporting this work.

**Table 10.** Essential Oil Components of *Origanum saccatum* Plants Planted in Adana for 2015 and 2016

| | Years | 2015 | | | | 2016 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Altitudes (m) | 1449 10 | 1323 33 | 1523 40 | 1196 49 | 1449 10 | 1323 33 | 1523 40 | 1196 49 |
| RT | Compounds | | | | | | | | |
| 3.21 | Tricyclene | - | - | 0.20 | - | 0.12 | 0.14 | 0.19 | 0.14 |
| **3.39** | **α-Pinene** | **6.36** | 0.83 | 1.27 | 0.56 | 0.98 | 0.83 | 1.38 | 1.35 |
| 3.44 | α-phellandren | 2.68 | 1.22 | 0.64 | 0.39 | 0.67 | 0.77 | 0.81 | 1.13 |
| **4.01** | **Camphene** | 0.52 | 0.90 | **4.67** | 1.65 | **2.62** | **2.06** | **3.94** | **2.99** |
| 5.97 | β-pinene | 1.11 | 1.06 | 0.53 | 0.24 | 0.18 | 0.14 | 0.21 | 0.21 |
| 6.01 | Myrcene | 0.88 | - | - | - | 0.45 | 0.41 | 0.50 | 0.88 |
| 6.32 | α-Terpinene | 0.83 | 1.22 | 0.81 | 0.64 | 1.07 | - | 1.11 | 1.77 |
| 6.8 | D-Limonene | 1.34 | 0.26 | 0.35 | 0.26 | 0.36 | 0.24 | 0.39 | 0.42 |
| **8.12** | **γ-terpinene** | **3.46** | **5.42** | **5.23** | **2.18** | **11.1** | **13.5** | **11.4** | **18.0** |
| **8.9** | **P-cymene** | **21.3** | **21.1** | **44.6** | **33.9** | **42.6** | **58.2** | **53.6** | **40.8** |
| **9.54** | **Methylcyclo** | **4.92** | 1.47 | - | - | 1.16 | 0.11 | 0.12 | 0.15 |
| 15.3 | 1-Octene-3-ol | 0.28 | 0.22 | 0.23 | 0.11 | 0.30 | 0.11 | 0.27 | 0.11 |
| 17.3 | Camphor | 1.30 | 0.43 | 0.23 | 0.13 | 0.31 | 0.13 | 0.46 | - |
| **19.0** | **Linalool** | 2.35 | 0.13 | **5.75** | - | 0.23 | - | 1.60 | - |
| 19.83 | Linalool acetat | - | - | 0.95 | 0.14 | 0.30 | - | 0.82 | 0.12 |
| 20.29 | β-Caryophyll | 2.63 | 0.26 | 0.86 | 0.55 | 0.53 | 0.18 | 1.03 | 0.61 |
| 20.81 | 4-Terpinenol | 0.65 | 0.62 | 1.02 | 0.61 | 0.50 | 0.43 | 0.56 | 0.37 |
| **23.61** | **cis-Verbenol** | **3.64** | 0.11 | 0.12 | 0.12 | 0.89 | - | 0.14 | - |
| **24.4** | **Isoborneol** | **7.01** | **2.22** | **8.93** | **3.99** | **9.45** | **4.12** | **6.79** | **4.58** |
| 25.3 | β-bisabolene | 0.86 | - | 0.36 | 0.56 | 0.44 | 0.16 | 0.45 | 0.48 |
| 27.18 | Cuminaldehyd | 0.21 | - | 0.14 | 0.28 | 0.41 | 0.21 | 0.23 | 0.11 |
| 29.83 | Nerol | 0.32 | - | - | 0.50 | 0.36 | 0.24 | 0.18 | 0.10 |
| 31.94 | trans-isoeugen | - | - | 0.19 | 0.15 | 0.33 | - | 0.17 | - |
| 33.66 | Caryophyllene oxide | 0.72 | 0.20 | 0.29 | 0.44 | 0.33 | 0.24 | 0.50 | 0.32 |
| 38.45 | Spathulenol | 0.44 | 0.13 | - | 0.45 | 0.20 | - | 0.12 | 0.19 |
| **40.82** | **Thymol** | 0.52 | 0.31 | - | **7.00** | 0.22 | 0.22 | - | 1.63 |
| **41.61** | **Carvacrol** | **33.80** | **58.5** | **20.8** | **43.6** | **23.2** | **15.2** | **12.4** | **21.9** |
| | Total (%) | 98.21 | 96.7 | 98.3 | 98.5 | 99.4 | 97.7 | 99.5 | 98.4 |
| | Component Number | 24 | 21 | 21 | 23 | 26 | 21 | 25 | 22 |

## REFERENCES

Antal T, Kerekes B, Sikoly L 2012. Effect of Vacum Freeze-Drying on Quality of Lemon Balm Leaves (*Melissa officinalis*, L.). Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Protecţia Mediului, XIX: 1-10.

Barakat A, Wakim LH, Apostolides NA, Srour G, Beyrouthy M.E 2013. Variation in the Essential Oils of *Thymbra spicata* L. Growing Wild in Lebanon According to the Date of Harvest. Journal of Essential Oil Research 25: 506-511.

Barata TM, Dorman DJH, Deans GS 1998. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. J. Essent. Oil Res. 10, 618–627.

Başer KHC, Kürkçüoğlu M, Demirci B, and Özek T 2003. The Essential Oil of *Origanum syriacum* L. var. *sinaicum* (Boiss.) Ietswaart. *Flav. Fragr. J.* 18(2), 98–99.

Baydar H, 2013. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi (Genişletilmiş 4. Baskı). Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 51, ISBN: 975-7929-79-4, SDÜ Basımevi. Isparta.

Baytop T, 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Nobel Yayınları, İstanbul, s. 253-255.Türkiye.

Ceylan A, 1995. Tıbbi Bitkiler I, E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, (312), Bornova, İzmir, 140s.

Davis PH, 1982. "Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburgh University Pres., Edinburg, 7:297-322.

Demirezer Ö, 1985. *Origanum saccatum* P.H. Davis üzerinde farmakognozik araştırmalar. Hacettepe Ünv., Sağlık Bilimleri Enst., Bilim Uzmanlığı Tezi. Ankara.

Figueiredo AC, Miguel MG, Duarte AMF, Barraso JG, Pedro LG 2001. Essential Oil Composition of *Thymus lotocephallus* G. Lopez and R.Morles, Collected During Flowering and Vegetative Phases. Flavour Fragr. J. 16(6): 417-421.

Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babac M T (edlr.) (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler).

Nezahat Gokyiğit Botanik Bahcesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.

Karık U, Cicek F, Oğur E, Birol D 2014. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, 23-25 Eylul

2014. Bingol.

Mammadov R, 2014. Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler. Nobel Akademik Yayıncılık, Yayın No:841, Ankara.

Maral H, Kırıcı S 2018. Ermenek'te Kekik Olarak Adlandırılan Bitkilerin Uçucu Yağ Oran ve Bileşenlerinin Belirlenmesi. Ermenek Araştırmaları II, Palet Yayınları, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 699, ISBN:978-605-7600-05-9, Türkçe (Bilimsel Kitap).

Maral H, Türkmen M, Kaya DA, Kırıcı S 2018a. Ermenek'te Endemik *Salvia Albimaculata* ve *Salvia Caespitosa* Bitkilerinin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi. Ermenek Araştırmaları II, PaletYayınları, Basım sayısı:1, SayfaSayısı 699, ISBN:978-605-7600-05-9, Türkçe(BilimselKitap).

Maral H, Kafkas EN, Çalışkan T, Kırıcı S. 2018b. The Effect of Altitudes on Composition and Content of Essential Oils of Endemic *Origanum saccatum* P.H. Davis. Intenational Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch.3(03): 242-246.

Özcan MM, Chalchat JC 2009. Chemical Composition and Antimicrobial Properties of the Essential Oil of *Origanum saccatum* L. J. of Food Safety. 29(4):617-628.

Said-Al Ahl HAH, Ömer EA, and Naguib,NY 2009. Effect of water stress and nitrogen fertilizer on herb and essential oil of oregano, Int. Agrophysics, 23, 269-275p.

Sözmen F, Uysal B, Oksal B, Odabaş Köse E, Deniz G 2011. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Origanum saccatum* P.H. Davis Essential Oil Obtained by Solvent-Free Microwave Extraction: Comparison with Hydrodistillation. Journal of AOAC International, Volume 94, Number 1.

Şirin E, Ertuğrul K 2015. Büyükeğri Dağı (Mut, İçel) ve Çevresinin Florası, Biological Diversity and Conservation (Biodicon), 8/2: 23-36.

Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., İlisulu, F., Sezik, G., 1985. Ermenek-Mut-Gülnar Yöresinin Tıbbi Bitkileri ve Ana Etken Maddelerinin Saptanması. II. *Leguminosae* Familyası" *Doğa Bilim Dergisi,* 9(1), 64-78.

TUBİVES, 2011. http://www.tubives.com/

Turgut K, Tugrul Ay S 2009. Agronomic Characteristics Of Oregano (*Origanum* spp.) Species Commonly Found in the Flora of Antalya. African Journal Of Traditional, Complementary And Alternative Medicines (AJTCAM), Abstracts Of The World Congress On Medicinal And Aromatic Plants, Cape Town, November. AJTCAM Issn: 0189-6016-P. 355-356.

Tümen G, Baser KHC, Kırımer N, Özek T 1994. Essential Oil of *Origanum saccatum* P. H. Davis. Journal of Essential Oil Research Volume 6, 1994 - Issue 5

Zeybek U, and Zeybek N, 2002. "Farmasötik Botanik", Değiştirilmiş 3. Baskı, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Bornova, İzmir, 3:378-387.

# Determination of volatile organic compounds by GC-MS and antioxidant capacity in methanol and ethanol extract of kale seed

Hafize Dilek Tepe*

*Manisa Celal Bayar University, Applied Science Research Center, Manisa, Turkey.

*Corresponding author e-mail: hafize.dilek@hotmail.com

## Abstract

Brassicaceae or Cruciferae plants are a large family of plants, including 338 genera and 3709 species, used in many fields from agriculture to human food, animal feeds, oil products and biofuels. Cabbage, broccoli, cauliflower, Brussels sprouts, and kale are often consumed as vegetables. Kale (Brassica oleracea L. var. Acephala) since ancient times, especially this plant grown widely in Turkey's eastern Mediterranean and Black Sea regions. It is reported that kale may contribute to neuroprotection due to its antioxidant and phytochemical properties, and it helps to reduce the risk of many types of cancer and heart diseases. To date, most of the studies done has been on the leaves of the kale plant. Therefore, there are not enough studies in the literature about seeds of kale. In this study, volatile organic compounds were determined with GC-MS, antioxidant capacity was determined by performing nitric oxide (NO) and DPPH scavenging (%) analysis in ethanol and methanol extract in the kale seeds. In addition, metal analysis was performed on the kale seeds with ICP-MS. Different results were obtained in the content of volatile organic molecules in methanol and ethanol extracts of kale seeds. Quite important compounds were observed in the results of methanol extraction. These; Sulforaphane nitrile, Palmitic acid. beta.-monoglyceride, Piperidine, 1- (3-hexenyl) -, Goitrin, Vitamin e, Ergost-5-en-3-ol, (3.beta.). Especially, sulforaphane derivatives have been shown in previous studies to be effective in reducing various tumors and apoptosis. In addition, it has been reported that the Ergost-5-en-3-ol molecule has anticancer, antioxidant, antiflammatory and hypocholesterolemic effects. Antioxidant activities were compared; NO and DPPH scavenging (%) levels were observed to be higher in methanol extraction. According to the result of ICP-MS analysis; it was found that the kale seeds are rich in Zn (41.77 µg / mL), Mn (27.51 µg / mL) and K (mg/mL).

**Keywords:** Brassica, sulforaphane, GC-MS, volatile organic molecules, antioxidants.

## INTRODUCTION

Brassicaceae or Cruciferae plants are a large family of plants, including 338 genera and 3709 species, used in many fields from agriculture to human food, animal feeds, oil products and biofuels (Verkerk et al., 2009; Franzke et al., 2011; Mourato et al., 2015). Cabbage, broccoli, cauliflower, Brussels sprouts, and kale are often consumed as vegetables (Mourato et al., 2015; Rakow, 2004; Podsedek, 2007). Kale (*Brassica oleracea L. var. Acephala DC.*) since ancient times, especially in the eastern Mediterranean and Black Sea countries in Turkey is a kind of plant that grows widely in the region (Balkaya and Yanmaz, 2005; Hagen et al., 2009). Kale plant is a useful vegetable variety containing high levels of antioxidant compounds, vitamin C and K, carotenoid, glucosinolates, essential fatty acids and other phenolic compounds compared to many cabbage varieties (Podsedek, 2007; Jahangir et al., 2009; Soengas et al., 2011). It is reported that kale may contribute to neuroprotection due to its antioxidant and phytochemical properties, and it helps to reduce the risk of many types of cancer and heart diseases (Ayaz et al., 2009, Alibas, 2009; Ferreres et al., 2009). This vegetable is very rich in glucosinolates. When vegetables are ground or chopped, myrosinase enzyme (thioglucoside glycohydrolase, EC 3.2.3.1) and glucosinolates come into contact. Myrosinase breaks the -thioglucoside bond of glucosinolate molecules, producing glucose, sulfate, and a diverse group of aglycone products. The resultant aglycones then undergo non-enzymetic, intramolecular rearrangement to yield isothiocyanates, thiocyanates or nitriles. Sulforaphane (4-methylsulfinybutyl isothiocyanate), derived from glucoraphanin (4-methylsulfinybutyl glucosinolate), is the most potent naturally occurring inducer of phase II enzymes, including quinone reductase and glutathione S-transferase (Prochaska et al., 1992). Moreover, sulforaphane can reduce the incident of a number of forms of tumors and induce cell cycle arrest and apoptosis in various experimental models (Zhang et al., 1992; Zhang et al., 1994; Fahey et al., 1997; Gamet-Payrastre et al., 2000; Singh et al., 2005). Significantly, even at dietary doses, sulforaphane can modulate the xenobiotic-metabolising enzyme systems, shifting the balance of carcinogen metabolism toward deactivation (Yoxall et al., 2005).

## MATERIALS AND METHODS

### Extraction Process

Kale seeds were obtained from a local market in Trabzon, Turkey. Before the extraction process, kale seeds were washed in pure water and dried in an oven at 80 °C. For analysis, the seeds were pulverized in high-speed plant mill and prepared for extraction. 5 g of powdered seed samples were extracted in 40 ml of 99,5% methanol and ethanol in ultrasonic bath for 30 minutes then left at room temperature. The final extraction concentrate was then adjusted to 50 mg / ml. DPPH and NO scavenging activities in percentage and GC-MS analyzes were determined using this extraction. ICP-MS analyzes were determined using powdered seed samples.

### DPPH and NO scavenging Activity

The antioxidant activity of the extracts was tested using the DPPH radical with minor modifications (Zhang et al., 2011). $2.10^{-4}$ M DPPH solution was prepared in methanol for this method. 0.5 ml was taken from each sample and on 4 ml of DPPH solution was added. The mixture was shaken and kept at room temperature for 60 minutes in the dark. 80% methanol was used as a blind and samples were read at 517 nm by spectrophotometer (TECAN Infinite M200 microplate reader). The results were calculated according to the following equation.

$$\text{DPPH scavenging activity \%} = (1\text{-Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{blind}}) \times 100$$

Nitric oxide scavenging activity was determined according to the following method (Marcocci et al., 1994). Four ml each of the extracts prepared in different concentrations were taken and 1 ml of sodium nitroprusside solution (25 mM) was added to the mixture and incubated for 2 hours at 37 °C. After incubation, 0.5 ml of the solutions were removed and mixed with 0.3 ml of Griess reagent (5% $H_3PO_4$ in 1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride). The absorbance of the formed chromophore was read against the blind at 570 nm on the spectrophotometer (TECAN Infinite M200 Microplate reader). The results were calculated

$$\text{NO scavenging activity \%} = (\text{Abs}_{\text{blind}} - \text{A}_{\text{s ample}} / \text{Abs}_{\text{blind}}) \times 100$$

### GC-MS Volatile Organic Molecule Determination

Volatile molecules in the extract were qualitatively analyzed in electron ionization (EI) mode with Agilent Technology 7890A Gas Chromatography (GC) Mass spectrometer (MS). Chromatographic column Agilent HP-5MS, capillary column (30 m* 0.25 mm, film thickness of 0.25 mm). The furnace temperature was started at 40 $^0$C, followed by standing for 5 minutes, then at 5 $^0$C. $min^{-1}$ at 280 $^0$C. and held for 5 min. Helium gas (99.999%) was used as the carrier gas. The constant flow rate is 1.5 ml $min^{-1}$ and the injector temperature is 250 $^0$C. The extract was injected in splitless mode with 1 ml. Interpretation of the mass spectrum was performed according to the National Institute of Standards and Technology (NIST, Wiley7Nist05.L) database. GC-MS Counts vs Acquisition Time of kale seed methanol and ethanol extraction were shown in **figure 1** and **figure 2**.

### ICP-MS Metal Analyzes

Microwave degradation was performed before metal analysis. 0.5 g of seed samples were taken and 10 mL of nitric acid was added. The microwave device (CEM, Mars 6, NC, USA) was degraded at 200 °C temperature, 15 min ramp, 20 min hold and 20 min cooling program. After microwave pretreatment, macro- and micronutrient contents (Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe 56, Fe 57, Cu, Zn) of samples were investigated using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (7700x Agilent, CA, USA). Calibration graphs were drawn and nutrient content analysis was done for each sample.

## RESULTS and DISCUSSION

Different results were obtained in methanol and ethanol extractions of black cabbage seeds in GCMS volatile organic molecule contents. Compound determination of methanol extraction was also observed to be more effective than ethanol (**Table 1 and Table 2**). Important compounds such as Piperidine, 1- (3-hexenyl) -, Goitrin, Succinaldehyde, Sulforaphane nitrile were determined in methanol extraction (**Table 1**). Counts vs acquisition time and counts vs mass to charge of this molecule was shown in **figure 3**. Purified sulforaphane

can be prepared by chemical synthesis (Whitesell and Wong, 1994; Schenk and Durr, 1997) and purification from plant (Kore et al., 1993; Matusheski et al., 2001). Chemical synthesis requires several highly toxic substances, and final products from these reactions still contain toxic residues and require further purification. This disadvantage limits synthesized sulforaphane to be used as food additives. Thus, natural sulforaphane is more favorable for common consumer.

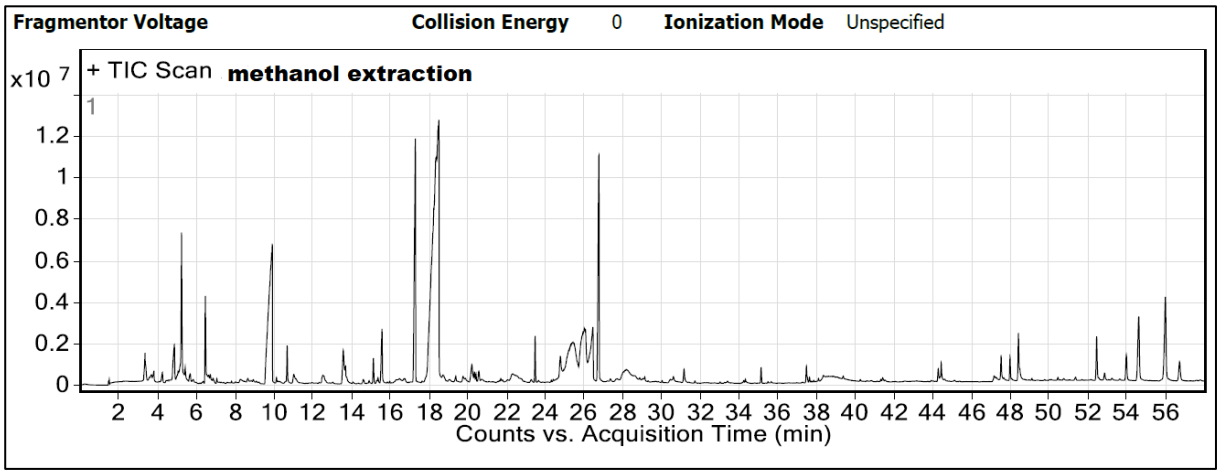



**Figure 1:** GC-MS Counts vs Acquisition Time of kale seed methanol extraction.

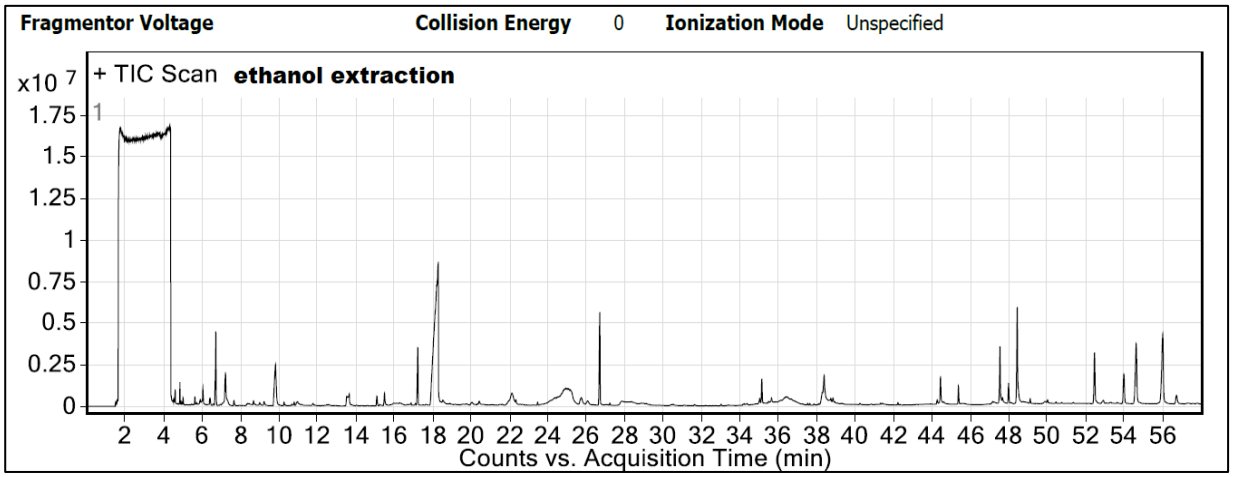



**Figure 2:** GC-MS Counts vs Acquisition Time of kale seed ethanol extraction

**Table 1.** Kale seed methanol extract GC-MS volatile organic molecule contents

| Cpd | Name | RT | Formula | Score | Library | CAS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Dimethyl ether | 3,34 | C2H6O | 86,05 | NIST11.L | 115-10-6 |
| 2 | Acetic acid, propyl ester | 4,85 | C5H10O2 | 81,61 | Wiley7Nist05.L | 109-60-4 |
| 3 | **Methallyl cyanide** | 5,23 | C5H7N | 89,43 | NIST11.L | 4786-19-0 |
| 4 | Propanoic acid, 2-oxo-, methyl ester | 5,67 | C4H6O3 | 88,14 | Wiley7Nist05.L | 600-22-6 |
| 5 | 2-Furancarboxaldehyde | 6,45 | C5H4O2 | 97,36 | Wiley7Nist05.L | 98-01-1 |
| 6 | Neopentane | 9,91 | C5H12 | 82,42 | NIST11.L | 463-82-1 |
| 7 | **1-Butene, 4-isothiocyanato-** | 10,67 | C5H7NS | 91,63 | Wiley7Nist05.L | 3386-97-8 |
| 8 | **Succinaldehyde** | 11,02 | C4H6O2 | 82,58 | Wiley7Nist05.L | 638-37-9 |
| 9 | 2,5-Furandicarboxaldehyde | 13,57 | C6H4O3 | 86,22 | Wiley7Nist05.L | 823-82-5 |
| 10 | .beta.-Damascenone | 13,69 | C13H18O | 76,69 | Wiley7Nist05.L | 23726-93-4 |
| 11 | 5H-Tetrazol-5-amine | 15,13 | CH3N5 | 74,63 | Wiley7Nist05.L | 0-00-0 |
| 12 | 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl- | 15,57 | C6H8O4 | 94,51 | NIST11.L | 28564-83-2 |
| 13 | Glycerin | 16,47 | C3H8O3 | 57,73 | NIST11.L | 56-81-5 |
| 14 | Pentanenitrile, 5-(methylthio)- | 17,29 | C6H11NS | 84,01 | NIST11.L | 59121-25-4 |
| 15 | 3-chloro-3-trifluoromethyl-6-oxa-2-thiatricyclo[3.2.1.0(5,7)]octane-2,2-dioxide | 18,25 | C7H6O3ClF3S | 54,66 | Wiley7Nist05.L | 120497-98-5 |
| 16 | **Piperidine, 1-(3-hexenyl)-** | 18,46 | C11H21N | 76,13 | Wiley7Nist05.L | 89110-21-4 |
| 17 | **5-Hydroxymethylfurfural** | **18,51** | **C6H6O3** | **92,13** | NIST11.L | 67-47-0 |
| 18 | Ethyl propionylacetate | 20,21 | C7H12O3 | 66,55 | Wiley7Nist05.L | 4949-44-4 |
| 19 | D-arabino-Hex-1-enitol, 1,5-anhydro-2-deoxy-3,4,6-tri-O-methyl- | 22,31 | C9H16O4 | 64,92 | Wiley7Nist05.L | 16740-98-0 |
| 20 | Silane, ethenylethoxydimethyl- | 23,47 | C6H14OSi | 66,32 | NIST11.L | 5356-83-2 |
| 21 | 2-(N-Morpholinyl)ethylphosphine | 24,77 | C6H14NOP | 71,4 | NIST11.L | 161944-94-1 |
| 22 | (Methylsilyl)diazomethane | 25,41 | C2H6N2Si | 57,67 | Wiley7Nist05.L | 0-00-0 |
| 23 | 6,6-DIDEUTERO-NONEN-1-OL-3 | 25,42 | C9H16D2O | 82,52 | Wiley7Nist05.L | 22381-85-7 |
| 24 | **Sulforaphane nitrile** | 26,01 | C6H11NOS | 75,7 | Wiley7Nist05.L | 61121-66-2 |
| 25 | Ethanone, 1-(4-nitrophenyl)- | 26,07 | C4H8N | 64,03 | Wiley7Nist05.L | 100-19-6 |
| 26 | **Goitrin** | 26,45 | C5H7NOS | 90,43 | NIST11.L | 500-12-9 |
| 27 | Ethanone, 1-(3,4-dimethoxyphenyl)- | 26,76 | C10H12O3 | 81,42 | Wiley7Nist05.L | 1131-62-0 |
| 28 | (2r,6R)-2-Isopropyl-6-methyl-1,3-dioxane-4-one | 28,18 | C8H14O3 | 69,66 | Wiley7Nist05.L | 100017-85-4 |
| 29 | **Palmitic acid .beta.-monoglyceride** | **44,43** | **C19H38O4** | **91,24** | Wiley7Nist05.L | 23470-00-0 |
| 30 | Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester | 47,52 | C21H42O4 | 88,33 | NIST11.L | 123-94-4 |
| 31 | 13-Oxabicyclo[10.1.0]tridecane | 47,98 | C12H22O | 86,8 | Wiley7Nist05.L | 286-99-7 |
| 32 | 13-Docosenamide, (Z)- | 48,42 | C22H43NO | 80,82 | Wiley7Nist05.L | 112-84-5 |
| 33 | .beta.-Tocopherol | 52,45 | C28H48O2 | 92,1 | NIST11.L | 148-03-8 |
| 34 | Vitamin e | 53,98 | C29H50O2 | 91,09 | Wiley7Nist05.L | 59-02-9 |
| 35 | Ergosta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E,24S)- | 54,63 | C28H46O | 80,83 | NIST11.L | 17472-78-5 |
| 36 | Ergost-5-en-3-ol, (3.beta.)- | 56,00 | C28H48O | 89,76 | NIST11.L | 4651-51-8 |
| 37 | Ergosta-4,7,22-trien-3-one | 56,73 | C28H42O | 64,84 | NIST11.L | 17398-57-1 |

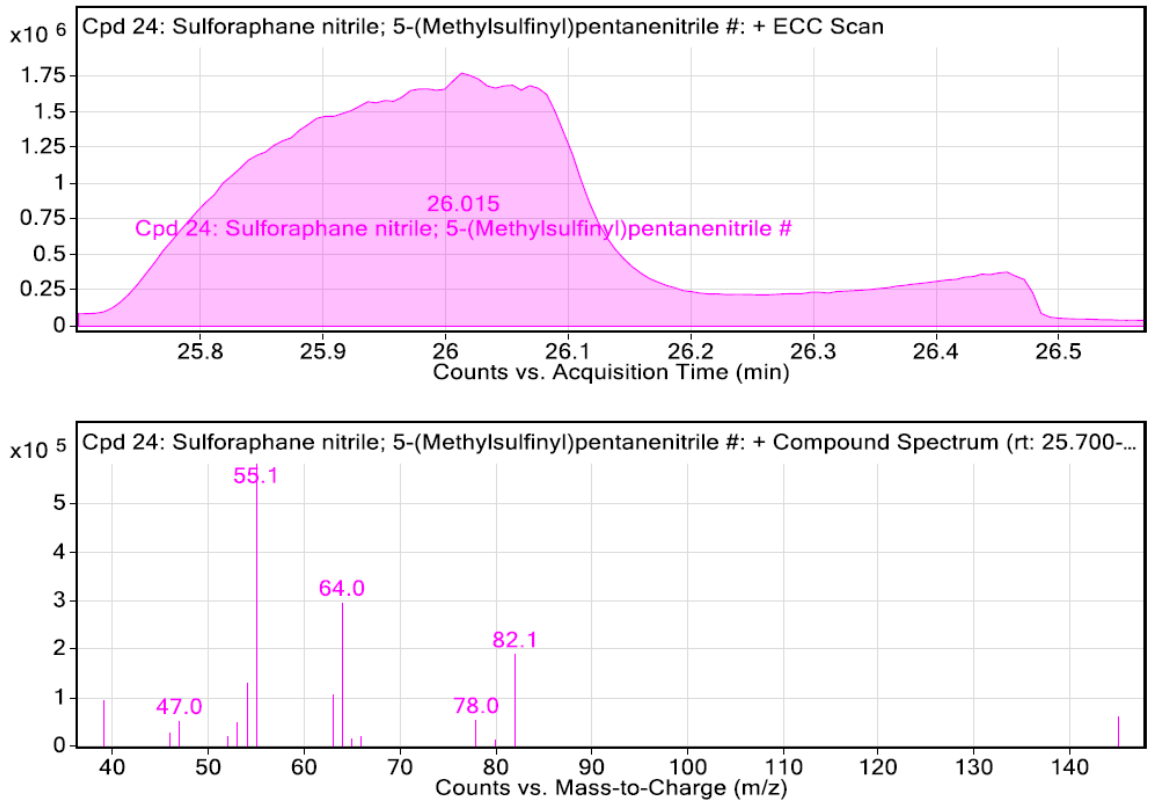



**Figure 3:** GC-MS Counts vs Acquisition Time, Counts vs Mass to Charge chart of kale seed methanol extraction (for sulforaphane nitrile molecule).

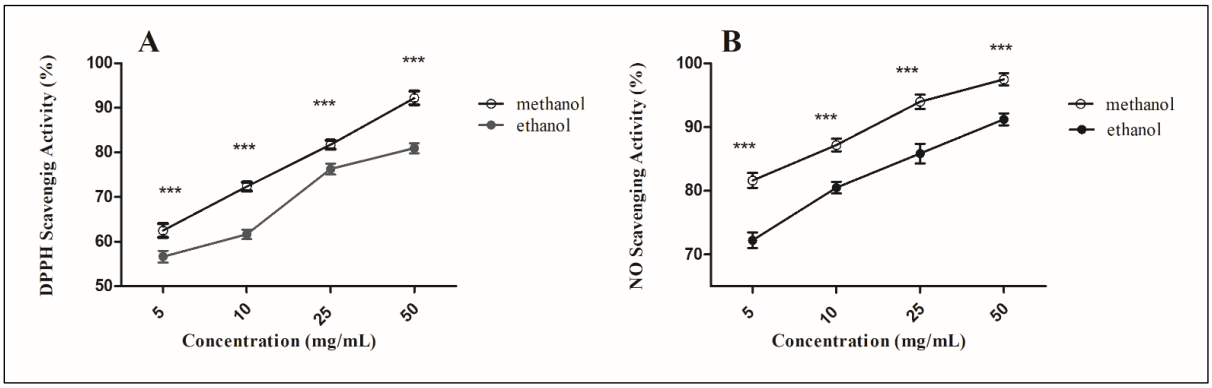



**Figure 4: A:** DPPH scavenging activity (%) in Kale seed methanol and ethanol extract, **B:** NO scavenging activity (%) in Kale seed methanol and ethanol extract. (n=3, P<0.01).

Comparing methanol and ethanol extractions, DPPH and NO scavenging activities (%) were observed to be higher in methanol extraction. For example, in 10 mg/mL extract samples, 10% difference in methanol was found in DPPH scavenging activity (%), in 50 mg/ml extract samples, the difference was determined to be 12% (**Figure 4A**). In NO scavenging activities (%) when comparing methanol and ethanol extracts in 10 and 50 mg / ml samples, there were differences between 9.5% and 7%, respectively (**Figure 4B**). In one study, they reported that the phenolic and antioxidant content was different for cabbage plants with different genotypes, and that wild species had higher antioxidant activity and total phenol levels (Murtaza et al., 2015).

According to the results of ICP-MS metal analysis in kale seed, the seed's Na, Mg, K, Mn, Fe (57) and Zn content was determined to be high. These amounts are as follows; 43.51 µg/g, 4.481 mg/g, 10.735 mg/g, 27.51 µg/g, 109.62 µg/g and 41.77 µg/g (**Table 3**). Kale is a rich source of dietary fiber or low molecular weight non digestible carbohydrates (LMWC); vitamins A, K, and C; and essential minerals potassium (K), calcium (Ca), and magnesium (Mg) (Migliozzi et al., 2015). A recent study shows that southern US-grown kale has the potential to provide significant quantities of several essential minerals and adequate quantities of LMWC, also known as "prebiotic carbohydrates", with moderate to low levels of protein and energy. For example, a 100 g single serving of fresh kale provides significant concentrations of K (188–873 mg/100 g), Ca (35–300 mg/100

g), Mg (20–100 mg/100 g), manganese (Mn: 0.2-2.3 mg/100 g), copper (Cu: 2–116 µg/100 g), and selenium (Se: 0–17 µg/100 g); 0.4-6.7 g of total beneficial LMWC, 1.6- 5.9 g of protein, and 36–98 kcal of energy (Thavarajah et al., 2016).

**Table 2.** Kale seed ethanol extract GC-MS volatile organic molecule contents

| Cpd | Name | RT | Formula | Score | Library | CAS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Methane, oxybis- | 1,7 | C2H6O | 83,31 | Wiley7Nist05.L | 115-10-6 |
| 2 | Acetic acid, hydroxy-, methyl ester | 2,638 | C3H6O3 | 76,98 | Wiley7Nist05.L | 96-35-5 |
| 3 | Nitric acid, methyl ester | 3,207 | CH3NO3 | 65,07 | Wiley7Nist05.L | 598-58-3 |
| 4 | Acetic acid, hydroxy-, methyl ester | 3,352 | C3H6O3 | 76,97 | Wiley7Nist05.L | 96-35-5 |
| 5 | formamidine hydrochloride | 4,088 | CH5N2Cl | 75,32 | Wiley7Nist05.L | 0-00-0 |
| 6 | Dimethyl ether | 4,358 | C2H6O | 84,33 | Wiley7Nist05.L | 115-10-6 |
| 7 | Propanal, 2-methyl- | 6,717 | C4H8O | 79,62 | Wiley7Nist05.L | 78-84-2 |
| 8 | 2-Furancarboxaldehyde | 7,216 | C5H4O2 | 97,62 | Wiley7Nist05.L | 98-01-1 |
| 9 | Neopentane | 9,821 | C5H12 | 85,85 | NIST11.L | 463-82-1 |
| 10 | Pentanenitrile, 5-(methylthio)- | 17,231 | C6H11NS | 84,12 | NIST11.L | 59121-25-4 |
| 11 | **5-Hydroxymethylfurfural** | **18,297** | **C6H6O3** | **94,14** | NIST11.L | 67-47-0 |
| 12 | 2,2-Dimethylcyclopropancarboxylic acid,cyanomethyl ester | 22,115 | C8H11NO2 | 65,21 | NIST11.L | 1000222-13-5 |
| 13 | Furazan-3-ol, 4-amino- | 22,145 | C2H3N3O2 | 70,77 | NIST11.L | 159013-90-8 |
| 14 | Hexanoic acid | 24,932 | C6H12O2 | 62,21 | Wiley7Nist05.L | 142-62-1 |
| 15 | Urea | 24,936 | CH4N2O | 70,78 | Wiley7Nist05.L | 57-13-6 |
| 16 | 3-Butyl-1,1-difluoro-2,2-dimethylcyclopropane | 25,081 | C9H16F2 | 66,2 | Wiley7Nist05.L | 131262-45-8 |
| 17 | Ethanone, 1-(3,4-dimethoxyphenyl)- | 26,707 | C10H12O3 | 81,43 | Wiley7Nist05.L | 1131-62-0 |
| 18 | 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- | 38,387 | C18H32O2 | 83,56 | NIST11.L | 60-33-3 |
| 19 | Palmitic acid .beta.-monoglyceride | 44,447 | C19H38O4 | 91,44 | Wiley7Nist05.L | 23470-00-0 |
| 20 | **Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester** | **47,543** | **C21H42O4** | **94,11** | NIST11.L | 123-94-4 |
| 21 | 13-Docosenamide, (Z)- | 48,441 | C22H43NO | 82,84 | Wiley7Nist05.L | 112-84-5 |
| 22 | .beta.-Tocopherol | 52,466 | C28H48O2 | 93,17 | NIST11.L | 148-03-8 |
| 23 | Vitamin e | 53,992 | C29H50O2 | 91,98 | Wiley7Nist05.L | 59-02-9 |
| 24 | Ergosta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E,24S)- | 54,637 | C28H46O | 88,18 | NIST11.L | 17472-78-5 |
| 25 | Ergost-5-en-3-ol, (3.beta.)- | 56,017 | C28H48O | 90,11 | NIST11.L | 4651-51-8 |

## CONCLUSION

In this study, especially in the Black Sea region in Turkey, widely grown and consumed as human food, seeds of kale plants were investigated. Most of the studies to date have been carried out on the leaves of the kale plant, but there are not enough studies in the seeds. It was observed that the seeds had quite high antioxidant capacities. Interesting volatile components have also been identified in the seeds of the plant, and these components can assist in future pharmacological studies.

**Table 3.** ICP-MS metal analysis results in kale seeds (n=3, P<0.01)

| Metal Name | Unit | Amount |
|---|---|---|
| Na | µg/g | 43.51±0.13*** |
| Mg | mg/g | 4.481±0.02*** |
| Al | µg/g | 14.93±0.19*** |
| K | mg/g | 10.735±0.03*** |
| Ca | mg/g | 3.129±0.18*** |
| Mn | µg/g | 27.51±0.01*** |
| Fe 56 | µg/g | 92.36±0.02*** |
| Fe 57 | µg/g | 109.62±0.03*** |
| Cu | µg/g | 3.700±0.04** |
| Zn | µg/g | 41.77±0.06*** |

## REFERENCES

Ayaz, FA, Glew RH, Millson M, Huang HS, Chuang LT, Sanz C, Hayırlıoglu-Ayaz S 2006. Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae L. var. acephala DC*.). Food Chemistry, 96(4): 572-579.

Alibas I. 2009. Microwave, vacuum, and air drying characteristics of collard leaves. Drying Technology, 27(11): 1266-1273.

Balkaya A, Yanmaz R 2005. Promising Kale *(Brassica oleracea var. acephala)* Populations from Black Sea Region, Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 33(1): 1-7.

Fahey JW Zhang Y, Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94:10367-72.

Ferreres F, Fernandes F, Sousa, C, Valentão, P, Pereira, JA, Andrade PB 2009. Metabolic and bioactivity insights into *Brassica oleracea var. acephala*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(19): 8884-8892.

Franzke A, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Koch MA, Mummenhoff K 2011. Cabbage Family Affairs: The Evolutionary History of Brassicaceae. Trends in Plant Science,16(2): 108-116.

Gamet-Payrastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Tercé F 2000. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. Cancer Research, 60:1426-33.

Hagen SF, Borgea GIA, Solhaugb KA, Bengtsson GB 2009. Effect of Cold Storage and Harvest Date on Bioactive Compounds In Curly Kale (*Brassica oleracea L. var. acephala)*. Postharvest Biology and Technology,51: 36–42.

Jahangir M, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R 2009. Health-Affecting Compounds In *Brassicaceae*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8: 31-43.

Kore AM, Spencer GF, Wallig MA 1993. Purification of the. omega.-(methylsulfinyl)alkyl glucosinolate hydrolysis products: 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)propane, 1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane, 4-(methylsulfinyl)butanenitrile, and 5-(methylsulfinyl)pentanenitrile from broccoli and Lesquerella fendleri. Journal of Agricultre and Food Chemistry, 41 (1): 9-95.

Marcocci I, Marguire JJ, Droy-Lefaiz, MT, Packer L 1994. Thenitricoxide scavenging property of Ginkgo biloba extract. Biochemical and Biophysical Research Communications, 201: 748-755.

Matusheski NV, Wallig MA, Juvik JA, Klein BP, Kushad MM, Jeffery EH 2001. Preparative HPLC method for the purification of sulforaphane and sulforaphane nitrile from *Brassica oleracea*. Journal of Agricultre and Food Chemistry, 49(4):1867-72.

Migliozzi M, Thavarajah D, Thavarajah P, Smith P 2015. Lentil and kale: complementary nutrient-rich whole food sources to combat micronutrient and calorie malnutrition. Nutrients, 7:9285-9298.

Mourato MP, Moreira IN, Leitão I, Pinto FR, Sales JR, Martins LL 2015. Effect of Heavy Metals In Plants Of The Genus Brassica. International Journal of Molecular Sciences,16: 17975-17998.

Murtaza I, Beigh GM, Shah TA, Hussain A, Khan AA, Kaur C 2005. Antioxidant activity and total phenolic content of kale genotypes grown in Kashmir valley. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 14: 215–217.

Podsędek A 2007. Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity of Brassica Vegetables: A Review. LWT - Food Science and Technology, 40 (1): 1–11.

Prochaska HJ, Santamaria AB, Talalay P 1992. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89:2394-2398.

Rakow G 2004. Species Origin and Economic Importance of Brassica. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 54: 3-7.

Schenk WA, Durr M 1997. Synthesis of (R)-Sulforaphane Using [ CpRu((R,R)-CHIRAPHOS)]+ as Chiral Auxiliary. The Journal of Organic Chemistry, 3: 713-716.

Singh SV, Srivastava SK, Choi S, Lew KL, Antosiewicz J, Xiao D, Zeng Y, Watkins SC, Johnson CS, Trump DL, Lee YJ, Xiao H, Antosiewicz AH 2005. Sulforaphane-induced Cell Death in Human Prostate Cancer Cells Is Initiated by Reactive Oxygen Species. Journal of Biological Chemistry. 280: 19911-19924.

Soengas P, Sotelo T, Velasco P, Cartea ME 2011. Antioxidant Properties of Brassica Vegetables. Functional Plant Science and Biotechnology. 5 (2): 43-55.

Thavarajah D, Thavarajah P, Abare A, Basnagala S, Lacher C, Smith P, Combs GF 2016. Mineral micronutrient and prebiotic carbohydrate profiles of USA-grown kale (Brassica oleracea L. var. acephala). Journal of Food Composition and Analysis, 52:9-15

Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, Schrijver RD, Hansen M, Gerh C, Mithen R, Dekker M 2009. Glucosinolates In Brassica Vegetables: The Influence Of The Food Supply Chain On Intake, Bioavailability And Human Health. Molecular Nutrition & Food Research, 53: S219 -S265.

Whitesell JK, Wong MS 1994. Asymmetric Synthesis of Chiral Sulfinate Esters and Sulfoxides. Synthesis of Sulforaphane. Journal of Organic Chemistry, 59 (3): 597-601.

Yoxall V, Kentish P, Coldham N, Kuhnert N, Sauer MJ, Ioannides C 2005. Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: implications for its chemopreventive activity. International Journal of Cancer, 117:356-62.

Zhang GW, He L, Hu MM 2011. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Prunella vulgaris L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. Innovative Food Science and Emerging,12(1): 18-25.

Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89:2399-403.

Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH, Talalay P 1994. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(8): 3147-3150.

# The investigation of the effect of different hemofiltration models on trace elements in acute renal failure patients

Fatma ATEŞ ALKAN[*1,2], Oktay DEMİRKIRAN[3], Ümit Bora BARUTÇU[2], Mehmet Ali KÖRPINAR[2]

[1*]Beykent University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Istanbul, TURKEY
[2*]Istanbul University-Cerrahpasa, Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Biophysics, Istanbul, TURKEY
[3]Istanbul University-Cerrahpasa, Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Anesthesia, Istanbul, TURKEY

[*]Corresponding author e-mail: fatmaalkan@beykent.edu.tr

## Abstract

Acute renal failure (ARF), is a manifestation that renal functions and liquid-electrolyte balance are destroyed. Continuous renal replacement therapy (CRRT), is a group of various treatment techniques that are implied to patients with renal function failure and liquid burden, considered as ARF. CRRT, describes the implementation of continuous extracorporeal blood filtration therapies, temporarily replacing hypoactive renal functions. Therefore, CRRT techniques named as hemodialysis, hemofiltration and hemodiafiltration are used. Trace elements are essential inorganic molecules. Alterations in trace element metabolism can be investigated as a result of renal failure. Trace element metabolism might be affected from diminished renal function, alteration in metabolic balance and CRRT used for renal failure. Thus, the aim of this study is to investigate the trace element filtration during CRRT in patients admitted to intensive care unit with acute renal failure and to reveal the possible alterations in the concentrations of trace elements in serum, urine and dialysate of these patients. Our study was planned as pre-treatment, 24 hours after the initial time and post-treatment by getting serum, urine and dialysate of these patients. The levels of trace elements (As, B, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Se, Si and Zn) were measured in serum, urine and dialysates via spectrophotometric method. All trace element levels except Se levels in serum, and B, Fe and Zn levels in dialysate, and in urine; variations were analysed that are statistically significant.

Consequently, we concluded that definition of changes in trace element levels is more appropriate when continuous veno-venous hemodiafiltration (CVVHDF) from CRRT is preferred.

**Keywords:** Acute Renal Failure, Continuous Renal Replacment Treatment, Hemodiafiltration, Trace Element, Intensive Care

## INTRODUCTION

Acute renal failure (ARF) occurs in approximately 2–5 % of hospitalized patients (Shusterman et al., 1987) and in 5–6 % of critically ill patients (Uchino et al., 2005). Critically ill ARF patients are often treated with continuous renal replacement therapy (CRRT). Given the wide variation in clinical practice relating to the indications for and timing of continuous renal replacement therapy (CRRT), patients who receive CRRT are considered to have reached stage three acute renal failure (ARF; or stage F of the RIFLE criteria; risk, injury, failure, loss, ESRD: end stage renal disease), irrespective of the stage that they are in at the time of CRRT initiation. (Kutsogiannis et al., 2005).

Trace elements are cofactors in enzymatic reactions. Deficiency of trace elements (such as Zn or Se) and excessive of potentially harmful trace elements (such as lead or arsenic) are both known to have adverse consequences in general population. (Shrimpton et al., 2005, Tonelli et al., 2009, Pasko et al., 2009) The optimal requirements of trace elements in critically ill patients and those with ARF are unknown. Trace elements, including chromium, copper, manganese, selenium and zinc, are typically added to daily parenteral nutrition in accordance with the daily requirements for intravenously administered trace elements set by the Nutrition Advisory Group of the American Medical Association (American Med. Assoc., 1979) and the Society of Clinical Nutrition (Greene et al., 1988).

The clearance of trace elements during CRRT has been investigated in adult ARF patients (Story et al., 1999, Berger et al., 2004, Churcwell et al., 2007). In published reports, only two used trace element assay technology sensitive enough to detect very low trace element concentrations in ultrafiltrate or dialysate (Berger et al., 2004, Churcwell et al., 2007). Compared with intermittent hemodialysis, the continuous nature of CRRT has the advantage of removing fluids and solutes slowly and consistently with less likelihood of causing hemodynamic compromise (Joy et al., 1998). CRRT allows the provision of adequate nutrition to meet the requirements of catabolism in ARF patients because of its expanded capacity to remove fluid and nitrogenous waste products (Wooley et al., 2005). Although CRRT removes waste products, it also removes beneficial medications and nutrients (Mueller et al., 2003). Further, the effect of CRRT on trace element clearance is largely unknown and requires further investigation (Nakamura et al., 2004, Churcwell et al., 2007). Story et al. (1999) reviewed the potential loss of chromium, copper, manganese, selenium and zinc in critically ill patients receiving continuous venovenous haemofiltration (CVVHF). Chromium and copper were found in the ultrafiltrate of CVVHF patients. Critically ill patients had lower blood concentrations of selenium and zinc whether or not they were receiving CVVH when compared with normal healthy volunteers. Klein et al. (2002) detected a small amount of zinc in the effluent of both their CVVHF and continuous venovenous haemodialysis (CVVHD) patients. The authors concluded that zinc losses were not large enough to merit additional zinc supplementation in patients treated with CRRT who are receiving zinc in their parenteral nutrition. Berger et al. (2004) reported that copper, selenium and zinc were found in the effluent during treatment with continuous venovenous haemodiafiltration (CVVHDF).

Limited information is available on CRRT drug removal but even less is known about nutrient clearance during CRRT, particularly the CRRT clearance of trace elements (Uchino et al., 2005, Churcwell et al., 2007). Available data on trace element abnormalities in renal failure patients have been generally derived from chronic renal failure patients. Exploration of these data to ARF patients is difficult especially for patients treated with CRRT. Information on optimal trace element requirements in patients receiving CRRT is scarce (Frankfield and Raynolds 1995).

The aim of this study is to investigate the trace element filtration during CRRT in patients admitted to intensive care unit with acute renal failure and to reveal the possible alterations in the concentrations of trace elements in serum, urine and dialysate of these patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient population

Following ethics committee approval (Istanbul University – Cerrahpasa - Cerrahpasa Medical Faculty) 60 critically ill patients (CVVHDF: 68 ± 9; CVVHF: 64 ± 13; CVVHD: 67 ± 10 years) receiving CRRT at Sad'i Sun Intensive Care Unit, Istanbul, Turkiye were enrolled from December 2010 to January 2012. The study patients were identified using the daily CRRT roster maintained in the intensive care unit of Cerrahpasa Medical Faculty. Patients were grouped by renal status: ARF with CRRT; Using CVVHDF (n:20); Group 1: pre-treatment, Group 2: 24 h after the initial and Group 3: post-treatment; CVVHF (n:20); Group 4: pre-treatment, Group 5: 24 h after the initial and Group 6: post-treatment, CVVHD (n:20). Group 7: pre-treatment, Group 8: 24 h after the initial and Group 9: post-treatment. CRRT was performed with prisma machine (Fresenius Medical Care, Bad Hamburg, Germany) according to a standard protocol. The filters (hallow fiber hemophan), and the replacement solutions and sodium bicarbonate were both supplied from the hospital. The final dialysate contained the following components $Na^+$:140 mmol/l, $K^+$:2,0 mmol/l according to the patients' need, $Ca^{++}$:1,5 mmol/l, $Mg^{++}$:0,5 mmol/l, $Cl^-$:111,0 mmol/l $HCO_3^-$:35 mmol/l and Glucose:1,0 g/l. Demographic details and basic CRRT properties are given in Table 1. At the time of the study, groups did not differ in the number of days in the intensive care unit (ICU) since injury (range 3 ± 1 days). The energy and protein intake from PN and enteral nutrition did not differ between CRRT groups, and the mean values are given in Table 1. The study groups were recruited as pre-treatment, 24 hours after the initial time and post-treatment by getting serum, urine and dialysate of these patients. Blood samples were centrifuged within 20 min at 4°C; serum, urine and dialysate were separated from cells immediately after centrifugation and stored at -80°C until analysed.

The trace element levels of prepared samples were determined by using inductively coupled plasma-optical emission spectrophotometer (ICP-OES Thermo iCAP - 6000) which was equipped with the plus auto sampler and controlled by a computer. In the study, 267.716; 327.396; 259.940; 285.210; 257.610; 196.090; 206.200; 189.042; 249.773 and 251.611 nm wavelengths were used to analyze Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Se, Zn, As, B and

Si levels, respectively. The plasmaoperating conditions for ICP-OES system in this study were 15 L/min plasma gas flow rate, 0.5 argon carrier flow rate, 1.51/min sample flow rate, and elution flow rate. The speed of the peristaltic pump was 100 rpm. Transport lines were made using a 1.25-mm-i.d. polytetrafluoroethylene tubing (Karış et al. 2019). Results were expressed in micrograms per milliliter µg/ml (ppm) level.

Statistical analysis was carried out with the statistical analysis software package SPSS for Windows 21. Trace element levels were assessed by ANOVA test following appropriate transformation to normalized data and equalized variance where necessary. Trace element levels were expressed as the mean and standard deviation (SD). Differences were considered significant when p values were less than 0.05 ($p<0.05$).

**Table 1.** Demographic Parameters and CRRT Outcomes of the Patients

| Treatment Method | CVVHDF (n=20) | CVVHF (n=20) | CVVHD (n=20) |
|---|---|---|---|
| Number of Patients (W / M) | 10 M / 10W | 14M / 6W | 11M / 9W |
| Age | 68 ± 9 | 64 ± 13 | 67 ± 10 |
| Weight (kg) | 74 ± 11 | 67 ± 10 | 76 ± 10 |
| ARF Reasons | AAF, Acidosis, ARF, Sepsis, CCF, COPD, Pneumonia, Stomach Cancer | AAF, Sepsis, ARF, Pneumonia, Lung Cancer | Sepsis, Acidosis, AAF |
| CRRT Reasons | ARF, Acidosis | ARF, Acidosis, Edema | ARF, Acidosis, Edema |
| Blood Flow Rate (ml/dk) | 137,42 ± 30,26 | 122,90 ± 23,6 | 111,4 ± 39,80 |
| Dialysate Flow Rate (ml/sa) | 1296,9 ± 441,2 | **2000,0 ± 433,0** $^{a**}$ | **1285,70 ± 267,3** $^{b*}$ |
| Replacement Fluid Rate (ml/sa) | 334,8 ± 132,5 | 316,67 ± 98,3 | **275,0 ± 50,0** $^{b*}$ |
| Fluid Rate (ml/sa) | 171,0 ± 74,2 | **270,0 ± 83,6** $^{a*}$ | **144,0 ± 72,3** $^{b*}$ |
| Application time (day) | 3 ± 1 | 3 ± 1 | 3 ± 1 |
| CRRT Anticoagulant | Heparin | Heparin | Heparin |
| Nutrition | TPN, Enteral | TPN, Enteral | TPN, Enteral |

## Figures

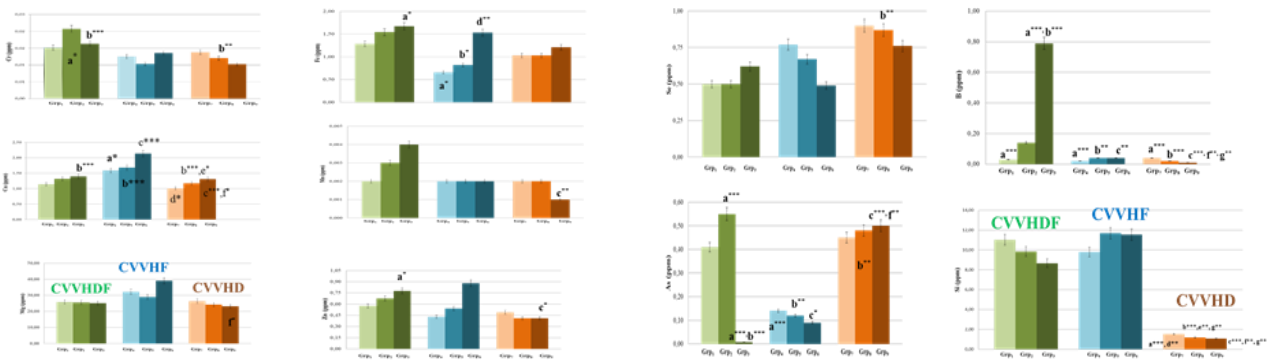



**Figure 1.** Serum element levels of CRRT groups

**Grp 1**: CVVHDF pre-treatment, **Grp 4**: CVVHF pre-treatment, **Grp 7**: CVVHD pre-treatment,

**Grp 2**: CVVHDF 24 hours after initial, **Grp 5**:CVVHF 24 hours after initial, **Grp 8**: CVVHD 24 hours after initial,

**Grp 3**: CVVHDF post-treatment, **Grp 6**: CVVHF post-treatment, **Grp 9**: CVVHD post-treatment.

[a] Statistical comparison Group 1, [e] Statistical comparison Group 5

[b] Statistical comparison Group 2, [f] Statistical comparison Group 6,

[c] Statistical comparison Group 3, [g] Statistical comparison Group 7,

[d] Statistical comparison Group 4, [h] Statistical comparison Group 8 with other groups.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

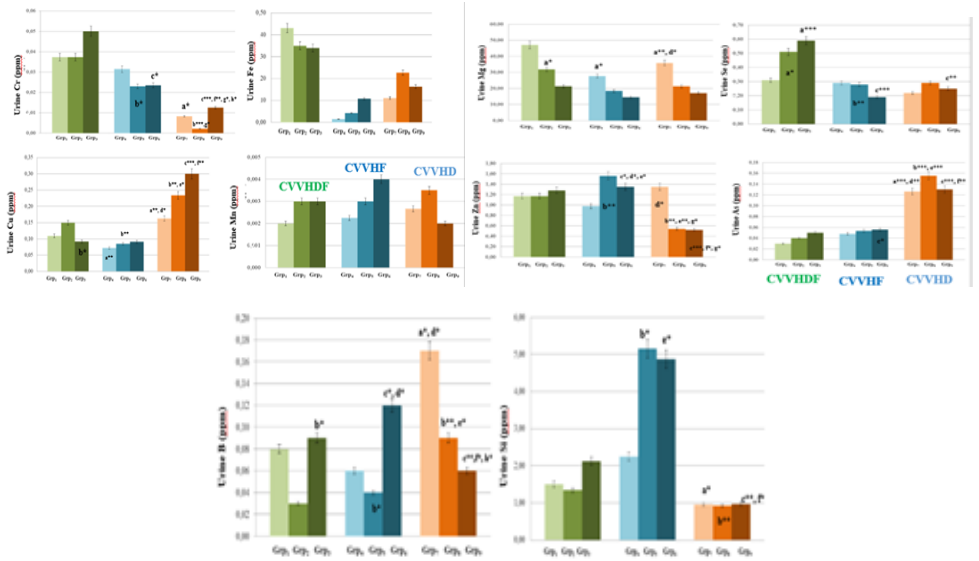



**Figure 2.** Urine element values of CRRT groups

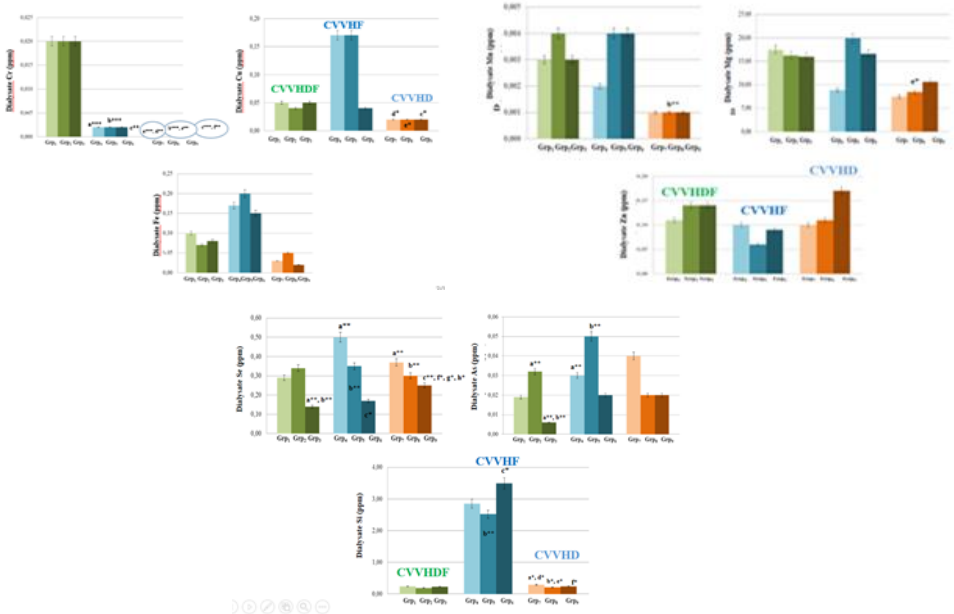



**Figure 3.** Dialysate element values of CRRT groups

## RESULTS and DISCUSSION

Acute renal failure (ARF) is common in hospitalized critically ill patients (Hui-Stickle et al., 2005). Continuous renal replacement therapy (CRRT) is often used to treat critically ill, hemodynamically unstable, pediatric patients with ARF. Compared with intermittent hemodialysis, the continuous nature of CRRT has the advantage of removing fluids and solutes slowly and consistently with less likelihood of causing hemodynamic compromise (Joy et al., 1998). CRRT allows the provision of adequate nutrition to meet the requirements of catabolism in critically ill ARF patients because of its expanded capacity to remove fluid and nitrogenous waste products (Wooley et al., 2005). Although CRRT accommodates the parenteral administration of large volumes of fluid and nutrition, it also removes nutritional solutes and drugs from plasma. Further, the effect of CRRT on trace element clearance is largely unknown and requires further investigation (Nakamura et al., 2004, Churcwell et al., 2007).

To explore the trace element changes caused by CRRT, analysis of Cu, Mg, Zn, Se, As trace elements measurements have been performed at serum and urine samples in the study groups. The effect of CRRT on trace elements at pre-treatment, 24 hours after the initial time, post-treatment groups serum and urine samples have been analysed in numerous studies (Pasko et al., 2009, Klein et al., 2008, Berger et al., 2004). However,

it is likely that critically ill patients have variability in their trace element serum and urine values depending on underlying illness and state of inflammation or infection. The studies reported by the authors associated with CRRT are either limited or we have not come upon these studies in the literature. No valuable evaluation of trace element levels between three different CRRT has been reported in the literature so far. In this study serum trace element values were detected from pre to post treatment values.

A significant overall increase in serum Cu from pre to post treatment groups values was observed for all groups. However, CVVHDF and CVVHD serum levels of Cu remained within the normal range of 0.6-1.37 ppm (Figure 1). Much higher and also increasing serum Cu values of 1.59±0.28 ppm pre-treatment groups and 2.14±0.44 ppm post–treatment groups in CVVHF patients have been reported. A recent study (Chen et al., 1997) reported elevated plasma Cu values of 1.3±0.28 ppm (n:26) before and 1.55±0.32 ppm (n:24) after CVVHD (controls n:25; 1.04 ± 0.25 ppm). Investigations of the kinetics of plasma Cu during CVVHD sessions revealed that plasma Cu is steadily increasing within the 3-5 hour of CVVHDF (Krachler et al., 1999) In CVVHDF patients even higher Cu values are documented (Renterghem et al., 1992). Lin T.H. et al (1996) reported significantly higher values of Zn and Cu values in post-treatment than pre-treatment CVVHD patients. Our study has also shown consistent results with these parameters for Cu values. Weisgarten et al. (2001) found that plasma ceruloplasmin levels as well as ceruloplasmin bound copper fraction were significantly lower in CVVHD patient compared with normal subjects. However, the free copper fraction was significantly higher in this patient group. This would tend to suggest that ceruloplasmin capacity to bind Cu was decreased in uremic plasma. Pasko and coworkers (2004) reported significantly higher levels of Cu but has not been reported in patients receiving PN. They found that higher accumulation of Cu in the liver have been found in cholestatic patients receiving long term PN. Cu may ARF in the liver and cause subclinical toxicities, even without a significant increase in serum Cu levels. In this study, Cu level was significantly higher in CVVHF patients than in other CRRT methods.

All serum Mg levels were higher than upper limit of the reference range for healthy adults (17-22 ppm). Even higher serum Mg values were found in a recent study at the beginning of the CVVHD slightly decreasing during CVVHD sessions (Krachler et al., 2000). In a previous study we found no significant differences in the serum Mg values among patients on different CRRT methods. When we compared treatment methods CVVHF (Group 6) and CVVHD (Group 9), post-treatment Mg values of Group 6 were found to be statistically higher than Group 9 ($p<0.05$). Leblanc et al (1995) were able to maintain average blood Mg in the normal range during CVVHD and CAVHD when dialysate contained 0.70 mmol/L of Mg; however, the amount of replacement Mg was not reported. Also Kierdorf et al. (1995), stated replacement fluid containing 0.50 mmol/L of Mg may not be sufficient to maintain blood Mg during CVVHF. There were several hours during CVVHDF when there was a net uptake of Mg into blood, increasing the risk for Mg toxicity. With the increasing values of Mg in blood, hypermagnesemia can produce hypotension, cutaneous flushing, and bradycardia. Higher concentrations of Mg have led to neuromuscular hypoexcitability, hypocalcemia, hyperkalemia, respiratory failure, and myocardial infarction (Morisaki et al., 2000). In a study of trauma patients (n:15) who were also receiving CVVHD with dextrose-free and Mg-free replacement fluid, mean blood Mg concentration was 0.70 mmol/L, which was higher than in our CRRT group (Frankfield et al., 1995). Mg levels in CVVHDF and CVVHD patients in our study were exactly the same as these groups.

In order to set Mg values to be added to the dialysate, replacement liquid and PN during SRRT performed to normalize the Mg values of blood, support the organ functions and increase the possibility of survival in post trauma period, further studies are deemed to be performed.

In agreement with Chen et al. (1997) a significant increase in Zn values during CVVHDF could be established for the Group 1 and Group 3 (Figure 1). Low serum Zn values have been noted for dialysed ad non-dialysed uremic patents (Arreola F. et al., 1993). However also much higher values of Zn in the plasma of 6 CVVHD patients (1.6±0.93 ppm) before and 1.6±0.14 ppm after dialysis) than in the plasma of healthy individuals (1.02±0.48 ppm) were reported (Salvadeo et al. 1979). The observed decreased plasma Zn levels in SVVHD patients may be connected with low zinc intake, dietary restriction in association with augmented Zn excretion which may be caused by either decreased zinc absorption or increased its excretion or both by gut (Klevay, 2000, Mahajen et al., 1989). Serum Zn values may vary between patients, depending on intake, losses, and

tissue distribution. Physiological stress (e.g. critical illness) increases the renal filtration and tissue redistribution of Zn. Intestinal Zn losses are increased in patients with diarrheal, short bowel syndrome, and high output fistulas, and patients with severe burns may also have increased losses of Zn through the wounds (Btaiche I.F., 2005). Zima et al. (1998) and Lee et al. (2000) have indicated significant decrease in Zn values in SVVHD patients as compared with healthy controls. Bozalioglu et al. (2005) found that the prevalence of hypozincemia in CVVHD patients was found to be 40%. They concluded that patients on maintenance hemodialysis for a short time exhibit zinc deficiency and disturbed immune response.

While in vitro and in vivo studies suggest substantial Se CRRT losses, others have found these losses to be less important (Nakamura et al., 2004, Berger et al., 2004, Story et al., 1999). Critically ill patients had lower blood values of Se and Zn whether or not they were receiving CVVHF when compared with normal healthy volunteers. (Churcwell et al., 2007). Se levels in CVVHF and CVVHD patients in our study were exactly the same as these results. Although Se levels of CVVHDF patients were measured low during treatment. Zapitelli et al. (2009) demonstrated that critically ill children receiving CVVHDF Se levels were increased. These results were the same as our CVVHDF patients.

The metabolism of inorganics has been neglected in trace element research. In a study of As metabolites in Flemish giant rabbits, De Kimpe et al. (1999) Observed disparate behaviour between organic and inorganic species that resulted from arsenate metabolism. Following the administration of a bolus of inorganic As, high values of inorganic species, such as arsenate and arsenite, peaked very early and than decreased thereafter. These inorganic speices are thought to exert the highest toxicity. As distribution in tissues varied widely, with the highest values in kidneys, liver and lungs. As accumulated in bone, compared with clearance rates in other tissues and blood (De Kimpe et al., 1996). In our study when we compared the values of pre-treatment and post-treatment groups As there was no statistically significant difference between CVVHF and CVVHD methods. CVVHD patients had the highest levels of As. Toxic inorganic species such as arsenite and arsenate were below the detection limit, making a comparison with healthy controls impossible (Zhanx et al. 1996, Zhanx 1995). In humans with ARF, the main detectable species were the relatively innocuous arsenobetaine ($3.6 \pm 4.6$ µg/l) and dimethylarsenic acid ($0.8 \pm 1.1$ µg/l) (Zhanx et al., 1996). As values were studied in seven chronic haemodialysis patients, and showed a correlation between intracellular As and serum As values. (De Kimpe et al., 1999). The magnitude of As accumulation may be related to the degree of chronic renal insufficiency. As is already increased for moderate degrees of renal failure as demonstrated in pre-dialysis out patients. Zhang et al. determined serum As compared with a normal value for a mean serum creatinine. Higher As values were found in serum samples (De Kimpe et al., 1999).

Also, in this study urine trace element values were detected from pre to post treatment values. When we compared the values of urine trace elements, Cu and As were significantly elevated in CVHDF patients as compared with other CRRT patients (CVVHF and CVVHD). However, CVVHDF patients had significantly lower urine values of Mg than the other CRRT patients (Figure 2). Klein et al. (2008) demonstrated that Zn values in urine for the uremic CRRT group for CVVHDF and CVVHF was significantly greater than for the control group. One obvious factor that contributed to the difference in urine Zn values between groups was the decreased volume of urine in CRRT patients. During intake-output studies, urinary Mg losses were 188% and 4.5% of normal (4.9 to 5.8 mmol/d) in control and CRRT groups, respectively. Urinary excretion of Mg typically increases after traumatic injury. Increased urinary Mg may be derived from bone and from muscle wasting as a result of inactivity and hypercatabolism (Mansouri et al.,1970). Bergstrom et al. (1987) analysed muscle biopsies from patients with multiple trauma (n: 25) and burns (n: 22) and determined that Mg content in muscle decreased the first week after injury and remained low for up to one month. In CRRT group for our study, Mg loss from urine showed a significant decrease for each group. During CRRT practice for patients cured for ABY diagnosis, sufficient level of Mg has been given through either PN or enteral nutrition. The observed decreased urine Mg values in CRRT for each group patients may be connected with sufficient Mg intake from PN and enteral nutrition.

In this study dialysate trace element values were detected from pre to post treatment values (Figure 3). Klein et al. (2008) concluded that patients treated with either one of CRRT treatment had twice values of dialysate - Mg compared with healthy controls. Dialysate - Mg values of CVVHDF in our study were consistent with this

study. In our study, dialysate Zn levels in CVVHDF, CVVHF, CVVHD groups were analysed, but no statistically significant change was detected.

## CONCLUSION

The serum and urine trace element values in CRRT patients were distinctly different to that of healthy adults. Although abnormal intake or losses of trace element in ARF are well documented, there are no specific guidelines to adjust trace element supplementation to account for the increased or decreased serum and urine trace element values. While little of the behaviour of trace elements is understood in healthy individuals, even less is known about trace element disturbances in uremic patients. The aim of this study is to investigate the trace element filtration during CRRT in patients admitted to intensive care unit with acute renal failure and to reveal the possible alterations in the concentrations of trace elements in serum and urine of these patients.

A wide range of trace element levels have been observed in critically ill patients. This study suggests that it may be prudent to monitor serum, urine and dialysate trace element values periodically and to evaluate the possibility of trace element deficiency and their accumulation particularly for patients on CRRT. Although these life-saving treatments may induce serious nutritional deficiencies of Cu and Zn, that can easily be treated by the use of appropriate supplementation.

Our study concluded that continuous veno-venous hemodiafiltration (CVVHDF) may be preferred as a CRRT for critically patients with acute renal failure.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 12211

## REFERENCES

American Medical Association, Nutrition Advisory Group Guidelines for essential trace element preparations for parenteral use. JAMA 1979; 241:2051–2054.

Arreola F, Panigua ., Perez A, Diaz-Bensussen S et al. 1993. Effect of zinc treatment on serum thyroid hormones in uremic patients under peritoneal dialysis. Horm Metab Res, 25: 539-542.

Berger MM, Shenkin A, Revelly JP, Roberts E, Cayeux MC, Baines M, Chioleo RN 2004. Copper, selenium, zinc, and thiamine balances during continuous venovenous hemodiafiltration in critically ill patients. Am J Clin Nutr, 80: 410-416.

Bergstrom JP, Larsson J, Nordstrom .et al. 1987. Influence of injury and nutrition on muscle water and electrolytes: Effect of severe injury, burns and sepsis. Acta Chir Scand, 153: 261–266.

Bozalioğlu S, Özkan Y, Turan M, Simşek B 2005. Prevalence of zinc deficiency and immune response in short-term hemodialysis. J Trace Elem Med Biol, 18(3): 243-249.

Btaiche IF 2005. Chronic complications associated with parenteral nutrition. In: Schumock G., Brundage D., Chessman K., et al. (eds) Pharmacotherapy self-assesment program (PSAP-V), 5th edn. The American College of Clinical Pharmacy, Kansas City, MO, 163-180.

Chen CK, Liaw JM, Juang JG 1997. Lin T.H. Antioxidant enzymes and trace elements in hemodialyzed patients. Biol Trace Elem Res, 58: 149-157.

Churchwell MD, Pasko DA, Btaiche IF, Jain JC 2007. Trace element removal during in vitro and in vivo continuous haemodialysis. Nephrol Dial Transplant, 22: 2970-2977.

De Kimpe J, Cornelis R, Wittevrongel L, Vanholder R, 1999. As-arsenate metabolism in Flemish giant rabbits with renal insuffiency. J Trace Elem Med Biol, 13: 7-14.

De Kimpe J,Cornelis R,Wittevrongel L, Vanholder R 1996. Dose dependent changes in 74As-arsenate metabolism of Flemish giant rabbits. J Trace Elem Med Biol, 12:193-200.

Frankenfield DC, Reynolds HN, Badellino MM et al. 1995. Glucose dynamics during continuous hemodiafiltration and TPN. Intensive Care Med, 21: 1016–1022.

Greene HL, Hambidge KM, Schanler R, Tsang RC 1988. Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the subcommittee on pediatric parenteral nutrient requirements from the committee on clinical practice issues of the American Society for Clinical Nutrition. Am J Clin Nutr, 48: 1324–1342.

Hui-Stickle S, Brewer ED, Goldstein SL 2005. Pediatric ARF epidemiology at a tertiary care center from 1999-2001. Am J. Kidney Dis, 45: 96-101.

Joy MS, Matzke GR, Armstrong DK, Marx MA, Zarowitz BJ 1998. A primer on contiuous reanl replacement therapy for critically ill patients. Ann Pharmacother, 32: 362-375.

Joy MS, Matzke GR, Armstrong DK, Marx MA, Zarowitz BJ 1998. A primer on continuous renal replacement therapy for critically ill patients. Ann Pharmacother, 32: 362–375.

Kiedorf H, Leue C, Heintz B et al. 1995. Continuous venovenous hemofiltration in acute renal failure: Is a bicarbonate-or lactate-based substituon better? Contrib Nephrol, 116: 38-47.

Klein CJ, Moser-Veillon PB, Schweitzer A et al. 2002. Magnesium, calcium, zinc, and nitrogen loss in trauma patients during continuous renal replacement therapy. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 26(2): 77-93.

Klein CJ, Nielsen FH, Veillon PB 2008. Trace element loss in urine and effluent following traumatic injury. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 32(2): 129-139.

Klevay LM 2000. In crıtical nutrition of the essential trace elements and minerals: the guide for health professionals, Bogden J.D. Klevay L.M., Eds., Humana Press Totowa NJ, Chapter 15.

Krachler M, Scharfetter H, Wirnsberger GH 2000. Kinetics of the metal cations magnesium, calcium, zinc, strontium, barium and lead in chronic hemodialysis patients. Clin Nephrol, 54(1): 35-44.

Kutsogiannis DJ, Gibney RT, Stollery D, Gao J 2005. Regional citrate versus systemic heparin anticoagulation for continuous renal replacement in critically ill patients. Kidney Int, 67: 2361-2367.

Leblanc M, Moreno L, Robinson OP et al. 1995. Bicarbonate dialysate for continuous renal replacement therapy in intensive care unit patients with acute renal failure. Am Kidney Dis, 26: 910-917.

Lee SH, Huang JW, Hung KY, Leu LJ, Kan YT, Yang CS, Chung WD, Huang CL, et al. 2000. Trace Metals' abnormalities in hemodialysis patients: relationship with medications. Artif Organs, 24(11): 841-844.

Lin TH, Chen JG, Liaw JM, Juang JG 1996. Trace elements and lipid peroxidation in uremic patients on hemodialysis. Biol Trace Elem Res, 51(3): 277-283.

Mahajen SK, Bowersox EM, Rye DL et al. 1989. Factors underlying abnormal zinc metabolism in uremia. Kidney Int, 36(27): 269-273.

Mansouri K, Halstead JA, Gombos EA 1970. Zinc, copper, magnesium, and calcium in dialyzed and nondialyzed uremic patients. Arch Intern Med, 125: 88–93.

Morisaki H, Yamamoto S, Morita Y, et al. 2000. Hypermagnesemia induced cardiopulmonary arrest before induction of anesthesia for emergency caesarean section. J Clin. Anesth, (12): 224-226.

Mueller BA, Pasko DA, Sowinski KM 2003. Higher renal replacement therapy dose delivery influences on drug therapy. Artif Organs, 27(9): 808-814.

Nakamura AT, Btaiche IF, Pasko DA, Jain JC, Mueller BA 2004. In-vitro clearance of trace elements via continuous venovenous hemofiltration. J Ren. Nutr, 14: 215-219.

Pasko DA, .Churchwell MD, Btaiche IF, Jain JC, Mueller BA 2009. Continuous venovenous hemodiafiltration trace element clearance in pediatric patients: a case series. Pediatr Nephrol, 24(4): 807-813.

Pasko DA, Churchwell MD, Mueller BA. 2004. Development of an in vitro model of continuous renal replacement therapy (CRRT) solute removal. Blood Purif, 22: 229.

Renterghem D, Coenelis R, Vanholder R 1992. Behaviour of 12 trace elements in serum of uremic patients on hemodiafilration. J Trace Elem Electrolytes Heatlh Dis, 6: 169-174.

Salvadeo A, Minoia C, Segagni S et al. 1979. Trace metal changes in dialysis fluid and blood of patients on hemodialysis. Int J Artif Organs, 2: 17-21.

Shrimpton R, Gross R, Hill I, Young M 2005. Zinc deficiency: what are the most appropriate interventions? BMJ, 330: 347-349.

Story DA, Ronco C, Bellomo R 1999. Trace element and vitamin concentrations and losses in critically ill patients treated with continuous venovenous hemofiltration. Crit Care Med, 27(1): 220-223.

Tonelli M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Klarenbach S, Field C, Manns B, Thadhani R, Gill J. 2009. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. BMC Medicine, 7(25): 1-12.

Uchino S, Kellum JA., Bellomo R et al. 2005. Acute Renal Failure in critically ill patients. JAMA, 294: 813-818.

Weissgarten J, Berman S, Bilchinsky R, Modai D, Averbukh Z 2001. Total cell-associated Zn2+ and Cu2+ and proliferative responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from patients on chronic hemodialysis. Metabolism, 50(3): 270-276.

Wooley JA, Btaiche IF, Good KL 2005. Metabolic and nutritional aspects of acute renal failure in critically ill patients requiring continuous renal replacement therapy. Nutr Clin Pract, 20: 176-191.

Zappitelli M, Juarez M, Castillo L, Coss-Bu J, Goldstein SL 2009. Continous renal replacement therapy amino acid, trace metal and folate clearance in critically ill children. Intensive Care Med, 35: 698-706.

Zhang X 1995. Determination of total arsenic in serum and packed cells of patients with renal insufficiency. Fresenius J Anal Chem, 353: 143-147.

Zhang XA, Cornelis R, De Kimpe J et al. 1996. Acuumulation of Arsenic species in serum of patients with chronic renal disease. Clin Chem, 42: 1231-1237.

Zima T, Mestek O, Nemecek K, Bartova V, Fialova J, Tesar V, Suchanek M 1998. Trace elements in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. Blood Purif, 16(5): 253-260**.**

# *Phaseolus vulgaris*'te metal tolerans proteininin (MTP) genom bazında analizi

Özlem Bakır[1*], Aybüke Okay[2], İlker Büyük[3], Sümer ARAS[4]

[*1]Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Bartın, Türkiye.
[2,3,4]Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye.

*Corresponding author e-mail: obakir@bartin.edu.tr

## Özet

Metal tolerans proteinleri (MTP), hücre, doku ve tüm bitki seviyelerinde metallerin taşınmasında rol alan ve Fe / Zn-MTP, Zn-MTP ve Mn-MTP olmak üzere 3 grupta değerlendirilen önemli bir protein ailesidir. Günümüze dek diğer bitki türlerinde MTP gen ailesine yönelik çalışmalar yapılmış olmasına rağmen fasulyede gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bu ihtiyaca yönelik olarak planlanan bu çalışmanın amacı *Phaseolus vulgaris* bitkisinde MTP proteinlerinin genom çapında in siliko olarak belirlenmesi ve karakterize edilmesidir. Biyoinformatik analizler neticesinde fasulye bitkisinde 12 adet MTP proteini tanımlanmış ve bu gen ailesi üyelerinin Zn-MTP alt ailesine ait olduğu belirlenmiştir. Bu proteinler 41.34 ile 91.05 kDa ağırlığına sahip olup, 369-813 arasında değişen amino asitten oluşmuştur ve izoelektrik noktaları 5.08 (Phvul-MTP-7) ile 8.97 (Phvul-MTP-9) arasındadır. PhvulMTP genlerinin fasulyenin 1,2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 ve 11 numaralı kromozomlarında dağıldığı ve PhvulMTP-9 geninin en fazla sayıda intron içeren gen olduğu tespit edilmiştir. Moleküler filogenetik analizler sonucunda ise PhvulMTP genlerinin 3 ana gruba ayrıldığı anlaşılmıştır. MTP genlerinin ifade profilleri bu genlerin farklı dokularda ifade olduğunu ortaya çıkarmış ve bitkinin gelişimi süresince çeşitli fizyolojik işlevlerde görev alabildiklerini de göstermiştir. Ayrıca tanımlanan PhvulMTP genlerinin promotör bölgelerinde farklı streslerle ilişkili çok sayıda cis elementi tanımlanmıştır. Fasulye bitkisinde MTP gen ailesinin biyoinformatik olarak tanımlandığı ve karakterize edildiği ilk çalışma olan bu çalışmadan elde edilen sonuçların gelecekteki fonksiyonel çalışmalar için önemli bir veri seti olabileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Stres, In siliko analiz, *Phaseolus vulgaris*, MTP, biyoinformatik

## Abstract

Metal tolerance proteins (MTP) are involved in the transport of metals at cell, tissue and all plant levels. It is an important protein family evaluated in 3 groups as Fe / Zn-MTP, Zn-MTP and Mn-MTP. Although studies have been carried out on the MTP gene family in other plant species to date, there is no study in beans. The aim of this study planned for this need in the literature is to identify and characterize MTP proteins in genome-wide in silico in *Phaseolus vulgaris* plant. As a result of bioinformatic analysis, 12 MTP proteins were identified in the bean plant and it was determined that members of this gene family belong to the Zn-MTP subfamily. These proteins weigh 41.34 to 91.05 kDa, are composed of amino acids ranging from 369 to 813, and their isoelectric points are between 5.08 (Phvul-MTP-7) and 8.97 (Phvul-MTP-9). It has been determined that PhvulMTP genes are distributed in the chromosomes of beans 1,2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 and 11 and PhvulMTP-9 gene contains the highest number of introns. As a result of molecular phylogenetic analysis, it is understood that PhvulMTP genes are divided into 3 main groups. Expression profiles of MTP genes have revealed that these genes are expressed in different tissues and have shown that they can function in various physiological functions during the development of the plant. In addition, a large number of cis elements associated with different stresses have been identified in the promoter regions of the identified PhvulMTP genes. It is the first study in the bean plant to identify and characterize the MTP gene family as bioinformatics, and we believe that the results obtained may be an important data set for future functional studies.

**Keywords:** Stress, In silico analysis, *Phaseolus vulgaris*, MTP, bioinformatics

## GİRİŞ

Bazı metal katyonları $Mn^{+2}$, $Zn^{+2}$, $Fe^{+2}$, $Cu^{+2}$, $Co^{+2}$ ve $Ni^{+2}$ fotosentez, DNA replikasyonu, kloroplastlar ve mitokondrilerde elektron taşınması ve diğer birçok metabolik süreç dahil olmak üzere bitkilerdeki birçok hücresel ve fizyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Birçok düzenleyici protein ve enzim için önemli kofaktörlerdir (Ricachenevsky ve ark.,. 2013; Yuan ve ark.,. 2012) ve esansiyel metal iyonlarındaki bir eksikliğin bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde olumsuz etkileri olabilir (Marschner 2011). Bitki hücrelerinde aşırı miktarda metal iyonu birikmesi toksisite ve büyüme inhibisyonu ile sonuçlanabilir (Cambrollé ve ark., 2015; Thomine ve Vert 2013). Katyon difüzyon kolaylaştırıcılar (CDF'ler) hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda tanımlanmıştır ve esas olarak $Cd^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Co^{2+}$ veya $Ni^{2+}$'nın sitozolden organellere veya hücrelerin dışına taşınmasında rol oynayan ve $Me^{2+}$ / $H^{+}$'e karşı var olan iyon taşıyıcı proteinlerdir. Metal iyonu taşıma protein (CDF) ailesi üç alt gruba ayrılır: (1) Mn-CDF'ler, (2) Fe / Zn-CDF'ler ve (3) Zn ve diğer metal iyonlarını taşıyan (Fe veya Mn hariç) çinko CDF'lerdir (Montanini) ve ark., 2007). Çoğu CDF proteininin dört ile altı transmembran alanı (TMD) ve sitoplazmik C-terminal alanı (CTD) vardır (Kolaj-Robin ve ark., 2015; Lu ve ark., 2009; Lu ve Fu 2007). Bitki hücrelerinde bulunan CDF'lere genellikle metal tolerans proteinleri (MTP'ler) (Fu ve ark., 2017) adı verilir. MTP'ler yedi filogenetik gruba ayrılmaktadır. Zn-CDF'ler grup 1 (MTP1-MTP4), grup 5 (MTP5), grup 12 (MTP12), grup 6 (MTP6), 7 (MTP7), grup 8 (MTP8) ile ve grup 9 (MTP9-MTP11) Mn-CDF'ler ve Fe / Zn-CDF'leri içermektedir (Gustin ve ark., 2011). Grup 1 CDF'leri sadece Zn'yi değil aynı zamanda diğer metalik iyonları da; Co (AtMTP3 ve HvMTP1), Cd (CMM1, CsMTP4, CitMTP1), Cu (CitMTP1), Ni (OsMTP1) ve Fe (OsMTP1) vakuolün içine taşıma yeteneğine sahiptirler (Arrivault ve ark., 2006; Blaudez ve ark., 2003; Fu ve ark., 2017; Kobae ve ark., 2004; Menguer ve ark., 2013; Migocka ve ark., 2015; Shahzad ve ark., 2010; Yuan ve ark., 2012). MTP8 proteinleri *Stylosanthes hamata* (ShMTP8), *Oryza sativa* (OsMTP8.1), *Cucumis sativus* (CsMTP8), *Hordeum vulgare* (HvMTP8.1 ve HvMTP8.2), *Citrus sinensis* (CitMTP8 ve CitMTP8.1) ve *Arabidopsis thaliana* (AtMTP8) Mn'yi vakuole veya golgi cisimciğine taşımaktadırlar (Chen ve ark., 2013; Delhaize ve ark., 2003; Eroğlu ve ark., 2016; Fu ve ark., 2017; Migocka ve ark., 2015; Vatansever ve ark., 2017). *Arabidopsis thaliana*'daki MTP'ler çok dikkat çekerken, diğer bitki türlerindeki MTP'ler daha az ilgi çekmiştir(Ueno ve ark., 2015). AtMTP12'nin 14 TMD'si vardır, AtMTP5 ile bir heterodimer oluşturur ve Zn'nin golgi cisimciklerine taşınmasında rol oynar (Fujiwara ve ark., 2015).Bitkilerdeki MTP'ler *A. thaliana* MTP aileleriyle olan benzerliklerine göre adlandırılmaktadır (Gustin ve ark., 2011).Mevcut çalışma, fasulyedeki MTP gen ailesini tanımlamak ve dizilerini yorumlamak için yapılmıştır. MTP'lerin fasulyede büyüme ve gelişmedeki rolünü anlamak için önemli bilgiler sağlamayı amaçlamaktadır. Bu çalışmada, fasulyede bulunan MTP'lerin filogenetik ilişkilerini, genom içindeki dağılımı, gen yapı düzenini, motiflerin kompozisyonunu, farklı dokulardaki ekspresyon profilleri karakterize edilmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Fasulye genomunda MTP genlerinin belirlenmesi

Fasulye genomundaki MTP gen ailesinin protein dizileri Pfam veritabanından elde edilen Pfam Erişim Numarası (PF01545) kullanılarak Phytozome veritabanı v12.1 (Anonymous, 2018a)'den elde edilmiştir. Fasulye genomundaki (Myburg ve ark., 2014) tüm muhtemel MTP genlerini belirlemek için, hem Phytozome veritabanın v12.1'deki blastp hem de gizli Markov model (HMM) (Anonymous, 2018b) araması varsayılan parametrelerle *Phaseolus vulgaris* genomunda taranmıştır. İlişkili olmayan diziler "decrease redundancy aracı" (Anonymous, 2018c) kullanılarak elde edilmiştir. İlişkili dizilerdeki MTP domainininin varlığı HMMER (Anonymous, 2018d) veritabanı kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen MTP proteinlerinin moleküler ağırlığı ve teorik izoelektrik noktası (pI) "ProtParam aracı" (Anonymous, 2018e) kullanılarak belirlenmiştir.

### MTP genlerinin yapısı, fiziksel yerleri, gen duplikasyonları ve korunmuş motiflerinin belirlenmesi

MTP proteinlerinin ekzon-intron bölgeleri hakkında bilgi edinmek için, Gene Structure Display Server v2.0 kullanılmıştır (Guo ve ark., 2007). Hem genom dizileri hem de kodlanan DNA (CDS) dizileri MTP genlerinin pozisyon bilgisini tahmin etmede kullanılmıştır. Phytozome veritabanı v12.1 kullanılarak, MTP genlerinin

kromozomal yerleri ve büyüklükleri belirlenmiştir. MTP genleri tüm *P.vulgaris* kromozomlarına işaretlenmiş ve MapChart programı ile çizilmiştir (Voorrips, 2002). Gen duplikasyon olayları "Bitki Genom Katlanma Veritabanı, BGKV" sağlayıcısı (Anonymous, 2018f) kullanılarak belirlenmiştir. MTP genlerinin ikili çiftleri arasındaki Non-sinonim oranları (Ka), sinonim oranları (Ks) ve evrimsel zorlamalar (Ka/Ks) PAL2NAL (Suyama ve ark., 2006) programı kullanılarak PAML arayüz aracında (Yang, 2007) hesaplanmıştır. MTP proteinlerinin ilave korunmuş motiflerini belirlemek için, "Multiple EM for Motif Elicition (MEME) Aracı" kullanılmıştır (Bailey ve ark., 2006). Minimum/maksimum genişlik ve Motiflerin maksimum sayısı için sınırlar sırasıyla 2, 50 ve 20 olarak ayarlanmıştır. Motif bölgeleri 2 ile 300 arasındadır.

**Filogenetik analizler ve dizi hizalama**

Filogenetik analizler, 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile Neighbor-joining (NJ) metoduna göre yapılmıştır. MTP protein dizileri ClustalW kullanılarak hizalanmıştır (Thompson ve ark., 1997). MEGA v7 programı kullanılarak filogenetik ağaç elde edilmiştir (Tamura ve ark., 2011). Ağaç, İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) arayüzü kullanılarak şekillendirilmiştir (Letunic ve Bork, 2011).

## İn siliko gen ekspresyon analizi

Kök_10, nodüller, kök_19, genç bakla, kök_10, kök_19, yeşil olgun tomurcuklar, yapraklar, genç triloliatlar, çiçek tomurcukları ve çiçekler de dahil olmak üzere bitkilerin özel doku kütüphanelerinde incelenen PhvulMTP genlerinin ifade seviyeleri Phytozome Veritabanı v12'den alınmıştır. İn silikodaki ekspresyon seviyeleri için FPKM (dizilen milyon baz çifti başına kilobaz transkript dizisi başına beklenen fragman sayısı) birimleri kullanılmıştır. FPKM değerleri log2 dönüştürülmüş ve heat-map haritası CIMMiner algoritması ile elde ediliştir (http://discover.nci.nih.gov/cimminer).

**Transkriptom verileri yoluyla PhvulMTP genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi**

Illumina RNA-seq verileri, PhvulMTP genlerinin ekspresyon seviyelerini ölçmek için Sekans Okuma Arşivinden (SRA) elde edilmiştir. Bu amaçla SRR957667 (yaprak-kontrol), SRR958472 (tuz ile muamele edilmiş kök), SRR958469 (kök-kontrol) ve SRR957668 (tuz ile muamele edilmiş yaprak) erişim numaraları kullanılmıştır (Hiz ve ark., 2014). Transkriptomik verilerin analizi, log2 dönüştürülmüş veriler kullanılarak Buyuk ve ark., (2016) tarafından tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, CIMMiner (Anonymous, 2018g) algoritması ile heatmap elde edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

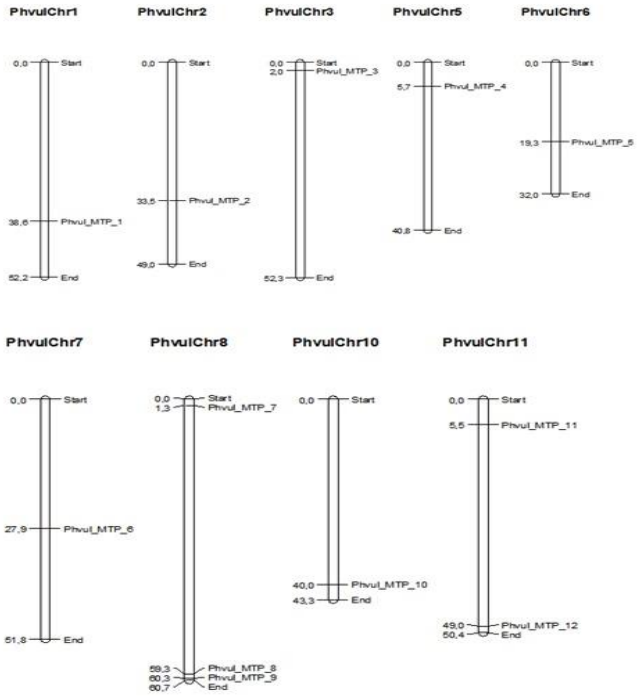
***P.vulgaris* genomundaki MTP gen ailesinin belirlenmesi**

Baklagiller ailesinden *P. vulgaris* bitkisinde tanımlanan MTP genlerinin dizileri kullanılarak *P. vulgaris* genomundan yapılan analizlerin sonucunda 12 MTP geni tanımlanmıştır. Önceki çalışmalarda *Vitis vinifera* L. (Shirazi ve ark., 2019) 14 MTP, *A.thaliana*'da (Fu ve ark., 2017) 12 MTP, *O.sativa*' da (Vatansever ve ark., 2017) 10 MTP proteini belirlenmiştir. *P.vulgaris* genomunda belirlenen MTP genleri 369 - 813 aminoasit uzunluğunda olup, molekül ağırlıkları 41,34 - 91,05 kDa arasındadır ve bu proteinlerin izoelektrik noktalarının hem asidik hem de bazik bölgede bulunduğu ama %75 gibi büyük bir kısmın asidik olduğu belirlendi; 9 tanesi asidik karakterli 3 tanesi de bazik karakterlidir (Tablo 1). PhvulMTP genlerinin toplamda 9 kromozoma dağınık dağıldığı tespit edilmiştir. En çok 8. kromozom üzerinde genlerin toplandığı görülmüştür (Şekil 1). *Phaseolus vulgaris* L. bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada Büyük ve Aras (2016) PhvGRF'lerin 7 kromozom üzerine lokalize olduklarını göstermiştir. *Brassica napus* L. bitkisi üzerinde yapılan çalışmada BnGRF'lerin 18 kromozomda lokalize olduklarını belirtmişlerdir (Li ve ark., 2017). *Nicotiana tabacum* L. bitkisinde Yang ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada 15 kromozom üzerine lokalize olduklarını saptamıştır.

**Tablo 1.**

| ID | *Phaseolus vulgaris* Genomic Database Identifier | Physical position on *Phaseolus vulgaris* genome Chromosome | Start position (bp) | End Position (bp) | Protein length (aa) | pI | Molecular weight (Da) | Instability index | Stable or unstable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Phvul_MTP_1 | Phvul.001G142750.1 | 1 | 38,584,393 | 38,590,197 | 369 | 7.85 | 41347.65 | 37.63 | stable |
| Phvul_MTP_2 | Phvul.002G176300.1 | 2 | 33,458,683 | 33,461,476 | 813 | 6.67 | 91052.87 | 45.33 | unstable |
| Phvul_MTP_3 | Phvul.003G021300.1 | 3 | 2,036,314 | 2,039,093 | 400 | 6.82 | 46015.30 | 41.59 | unstable |
| Phvul_MTP_4 | Phvul.005G049300.1 | 5 | 5,742,223 | 5,745,905 | 396 | 8.36 | 45422.77 | 41.51 | unstable |
| Phvul_MTP_5 | Phvul.006G080700.1 | 6 | 19,279,972 | 19,283,798 | 413 | 5.44 | 46160.95 | 50.45 | unstable |
| Phvul_MTP_6 | Phvul.007G165166.1 | 7 | 27,868,704 | 27,875,618 | 490 | 6.55 | 53209.01 | 45.77 | unstable |
| Phvul_MTP_7 | Phvul.008G015500.1 | 8 | 1,278,190 | 1,282,357 | 396 | 5.08 | 44981.47 | 39.58 | stable |
| Phvul_MTP_8 | Phvul.008G244200.1 | 8 | 59,266,794 | 59,270,519 | 396 | 5.30 | 44621.21 | 42.74 | unstable |
| Phvul_MTP_9 | Phvul.008G254900.1 | 8 | 60,275,655 | 60,280,726 | 422 | 8.97 | 46767.84 | 35.47 | stable |
| Phvul_MTP_10 | Phvul.010G119900.1 | 10 | 40,027,163 | 40,032,105 | 417 | 5.96 | 46279.99 | 30.46 | stable |
| Phvul_MTP_11 | Phvul.011G061200.1 | 11 | 5,461,191 | 5,463,025 | 389 | 5.94 | 42465.85 | 24.85 | stable |
| Phvul_MTP_12 | Phvul.011G178800.1 | 11 | 48,990,728 | 48,998,083 | 407 | 6.77 | 46469.77 | 46.31 | unstable |

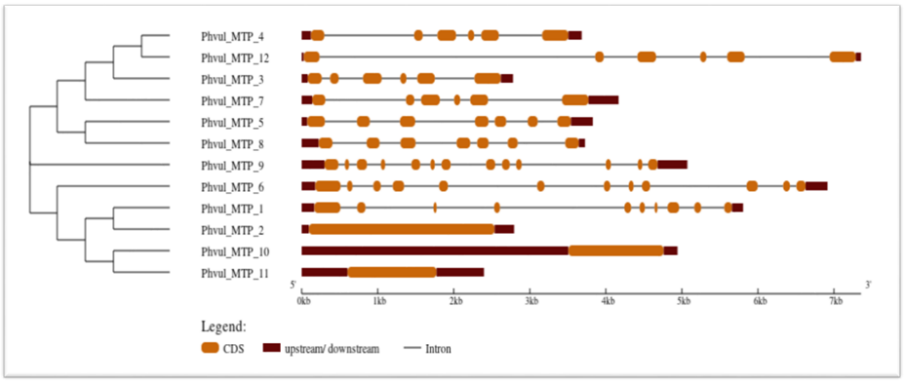
Fasulye genomunda bulunan MTP genleri hakkında bilgi




**Şekil 1.** MTP genlerinin fasulye kromozomlarındaki dağılışı

## MTP Genlerinin Yapısı ve Tandem – Segmental Duplikasyonlar

PhvulMTP genlerinin ekzon ve intron bölgeleri yani gen yapıları belirlenmiştir. Buna göre Phvul_MTP_2, Phvul_MTP_10 ve Phvul_MTP_11 genleri hariç tamamının ekzon ve intron içerdiği tespit edilmiştir ve bu genlerin çoğunun yaklaşık olarak eşit oranda ekzon ve intron bölgesi bulundurduğu fakat ağırlıklı olarak ekzon bölgesi bulundurduğu tespit edilmiştir. Phvul_MTP_2, Phvul_MTP_10 ve Phvul_MTP_11 genlerinin intron içermediği tespit edilmiştir. En uzun intron bölgesi içeren genin Phvul_MTP_12 olduğu tespit edilmiştir. Sayıca en çok ekzon bölgesi içeren genin ise Phvul_MTP_9 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).




**Şekil 2.** MTP genlerindeki ekzon ve intronların sayısı, uzunluğu ve pozisyonu

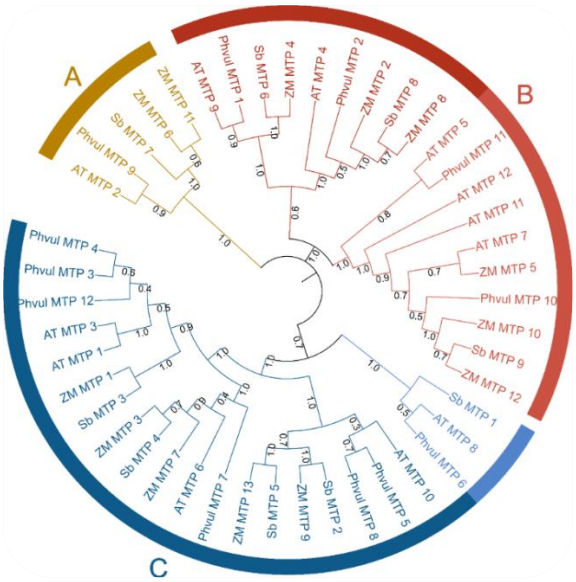
E değerlerinden yararlanılarak duplikasyona uğramış gen çiftleri hesaplandı. Buna göre tandem duplikasyona hiç rastlanılmadı. Belirlenmiş olan *P. vulgaris* genomunda MTP genlerine ait segmental duplikasyonlar sonucu 13 gen çifti elde edildi, bunlar arasından en çok Phvul_MTP_3'ün duplikasyona uğradığı anlaşıldı (Tablo 2). Ka/Ks oranı 1'den büyükse gen dizisinin evrimi süresince pozitif seleksiyon olduğu, 1'den küçük olması arındırıcı seleksiyon ve 1'e eşit olması ikileleşme olaylarında doğal seleksiyonu göstermektedir (Juretic ve ark., 2005).Ka/Ks oranları her biri için 1'den küçüktür bu nedenle gen dizisinin evrimi süresince arındırıcı seleksiyon olduğu görüldü.

| Gene 1 | Kro. | Gene 2 | Kro. | E değeri | Homoloji (%) | Ks | Ka | Ka/Ks |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Phvul_MTP_3 | 3 | Phvul_MTP_12 | 11 | 179 | 88 | 3.3397 | 0.2560 | 0.0766 |
| Phvul_MTP_3 | 3 | Phvul_MTP_7 | 8 | 141 | 57.6 | 27.9206 | 0.3553 | 0.0127 |
| Phvul_MTP_3 | 3 | Phvul_MTP_5 | 6 | 113 | 55.2 | 50.5753 | 0.4685 | 0.0093 |
| Phvul_MTP_3 | 3 | Phvul_MTP_8 | 8 | 111 | 51.9 | 48.0582 | 0.4609 | 0.0096 |
| Phvul_MTP_4 | 5 | Phvul_MTP_7 | 8 | 163 | 62.8 | 28.4908 | 0.3220 | 0.0113 |
| Phvul_MTP_4 | 5 | Phvul_MTP_5 | 6 | 127 | 55.1 | 10.9010 | 0.4570 | 0.0419 |
| Phvul_MTP_4 | 5 | Phvul_MTP_8 | 8 | 120 | 53.8 | 26.6532 | 0.4799 | 0.0180 |
| Phvul_MTP_5 | 6 | Phvul_MTP_12 | 11 | 115 | 60.6 | 11.7128 | 0.4601 | 0.0393 |
| Phvul_MTP_5 | 6 | Phvul_MTP_7 | 8 | 104 | 56.1 | 48.7929 | 0.4870 | 0.0100 |
| Phvul_MTP_7 | 8 | Phvul_MTP_12 | 11 | 159 | 58.9 | 45.4185 | 0.3242 | 0.0071 |
| Phvul_MTP_8 | 8 | Phvul_MTP_5 | 6 | 151 | 70.8 | 0.6169 | 0.1448 | 0.2347 |
| Phvul_MTP_8 | 8 | Phvul_MTP_12 | 11 | 124 | 55.3 | 4.7346 | 0.4781 | 0.1010 |
| Phvul_MTP_10 | 10 | Phvul_MTP_11 | 11 | 47 | 56.3 | 4.8969 | 0.4461 | 0.0911 |

**Tablo 2.** Tandem ve Segmental Duplikasyon Tablosu

**MTP genlerinin filogenetik analizleri, korunmuş motifleri ve gen yapısı**

*P. vulgaris*'te bulunan MTP ve birbirinden farklı X tür arasındaki MTP genlerinde evrimsel ilişkileri belirlemek amacıyla MEGA7 [Molecular Evolutionary Genetic Analysis] programı kullanılarak filogenetik ağaç analizi yapıldı. Birbirlerine en yakın genlerin aynı kavşak altında toplanması amaçlandı bu yüzden Maximum Neigbour-joining yaklaşımı kullanıldı. Oluşturulan filogenetik ağaçta *P. vulgaris*'ten elde edilen toplam 12 MTP geni ve diğer türlerle birlikte toplam 46 MTP geni 3 ana sınıfta kategorize edilmiştir. (A, B, C) En büyük grubu C grubu oluşturmaktadır; 22 gen bulunmaktadır. En küçük grubu ise; 5 gen ile A grubu oluşturmaktadır. En çok segmental duplikasyon gösteren Phvul_MTP_3 ve Phvul_MTP_4 genlerinin ise C grubunda yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 3).




**Şekil 3.** *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, *Sorgum bicolor*, *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin SOD proteinleri ile çizilen filogenetik ağaç

Filogenetik ağacın güvenilirliğini tespit etmek için motif kompozisyonlar incelenmiştir. Benzer motif grupları MTP genleri arasında yapısal bir benzerliğin belirlenmesi için kolaylık sağlamaktadır. PhvulMTP proteinleri için birbiri ile ilişkili motifleri ortaya çıkarmak amacıyla toplamda 20 farklı korunmuş motif tanımlanmıştır. Aynı korunmuş bölgeleri içeren genlerin aynı gruplarda yer aldığı tespit edilmiştir. Buradan genler arasında ne kadar benzer motif bölgeleri varsa evrimsel anlamda da birbirine yakın genler olduğu sonucuna ulaşılmıştır. En fazla motif Phvul_MTP_3 (10 motif), en az motif ise Phvul_MTP_9 (2 motif) elde edilmiştir (Şekil 4). Örneğin, Li ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada, *Brassica napus* L. bitkisinde ve Yang ve ark. (2017) yaptığı çalışmada *Nicotiana tabacum* L. bitkisinde 20'şer motif gözlenmiştir.

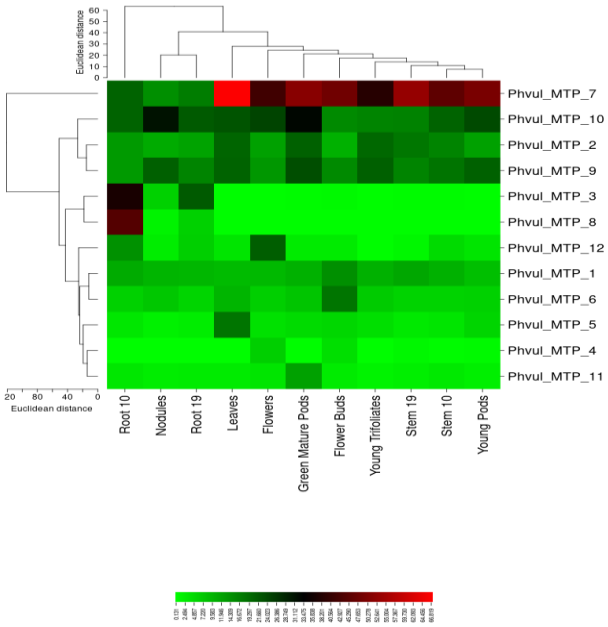



**Şekil 4.** MTP genlerinde tahmin edilen motiflerin dağılımı

**PhvulMTP genlerinin dokuya özgü mRNA seviyeleri**

Phytozome v12.1 online plant genomics resource kullanılarak *PhvulMTP* genlerinin mevcut ekspresyon dataları tespit edilmiştir. Farklı bitki dokularından 12 *PhvulMTP* geninin mRNA seviyelerinden türetilmiş olan

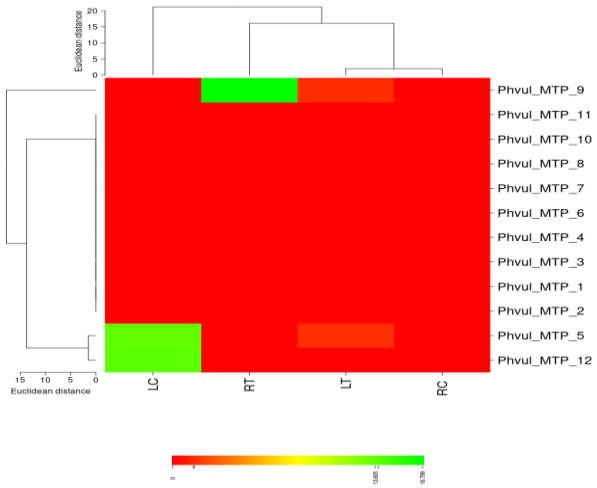
heatmap oluşturulmuştur buna göre; fasulyenin farklı dokularında *PhvulMTP* genlerinin rolleri saptanmaya çalışılmıştır ve bütün *PhvulMTP* genlerinin tamamında birbirinden farklı ifade seviyeleri ortaya çıkmıştır. *Phvul-MTP-7'nin* neredeyse bütün dokularında; Kök_10, nodüller, kök_19, genç bakla, kök_10, kök_19, yeşil olgun tomurcuklar, yapraklar, genç triloliatlar, çiçek tomurcukları ve çiçekler yüksek ekspresyon seviyeleri görülmüştür (Şekil 5).




**Şekil 5.** PhvulMTP genlerinin bitkinin farklı dokularında yapılan ifade analizi (Heatmap)

## MTP genlerinin tuz stresine cevabındaki rolü

Mevcut SRA dataları kullanılarak *PhvulMTP* genlerinin RNAseq analizi yapılmıştır. *PhvulMTP* genlerinin tuz stresi koşulları altında yaprak ve kök dokularında birbirinden farklı ekspresyon seviyeleri ortaya çıktığı görülmüştür. Yaprak dokularında *Pvul-SOD-5 ve 12* genlerinin tuz stresi altında ifade sevileri azalıyorken, *Phvul-SOD-9'da* az da olsa bir artış görülmüştür. Kök dokularında ise yalnızca *Phvul-SOD-9'da* değişiklik olmuş *ve* tuz stresi altında ifade seviyesi artmıştır (Şekil 6).




**Şekil 6.** Tuz stresi altında PhvulMTP genlerinin ifade analizi (Heatmap)

## SONUÇ

*Phaseolus vulgaris* genomunda MTP gen ailesi ile siliko olarak yapılan bu çalışmada 8 MTP üyesi tespit edilmiştir. MTP, olumsuz koşulların neden olduğu oksidatif hasara cevap vermede bitki antioksidan sisteminin önemli bir enzimidir. Fasulye bitkisinin in siliko olarak gerçekleştirilen gen ifadesi analizlerinde ise MTP genlerinin ifade farklılıkları belirlenmiştir. MTP genlerinin ifade profilleri bu genlerin farklı dokularda ifade olduğunu ortaya çıkarmış ve bitkinin gelişim süresince çeşitli fizyolojik işlevlerde görev alabildiklerini de göstermiştir. Fasulyedeki MTP gen ailesi üzerinde daha fazla fonksiyonel araştırma için bir temel sağlamaktadır. Sonuç olarak çalışmamız, MTP genlerinin fonksiyonlarının çalışılması için sonraki çalışmalara ışık tutucu niteliktedir ve farklı türlerde MTP genlerinin evriminin anlaşılmasına önemli katkılar sağlayabilir.

## KAYNAKLAR

Anonymous, 2018a. Phytozome Database. https:// phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html (Erişim tarihi: 20.02.2018).

Anonymous, 2018b. Hidden Markov Model (HMM). http://www.ebi.ac.uk (Erişim tarihi: 20.02.2018).

Anonymous, 2018c. Decrease Redundancy Tool. http:// web.expasy.org/decrease_redundancy/ (Erişim tarihi: 20.02.2018).

Anonymous, 2018d. HMMER. http://www.ebi.ac.uk (Erişim tarihi: 20.02.2018).

Anonymous, 2018e. ProtParam. http://web. expasy.org/protparam (Erişim tarihi: 20.02.2018).

Arrivault S, Senger T, Krämer U 2006 The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. Plant J 46:861–879

Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW 2006. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. Nucleic Acids Research, 34: W369-W373.

Cambrollé J, García J, Figueroa M, Cantos M (2015) Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. Chemosphere 120:171–178

Eroglu S, Meier B, von Wirén N, Peiter E 2016. The vacuolar manganese transporter MTP8 determines tolerance to iron deficiency-induced chlorosis in Arabidopsis. Plant Physiol 170:1030–1045

Fu X-Z ve ark., 2017. Genome-wide identification of sweet orange (Citrus sinensis) metal tolerance proteins and analysis of their expression patterns under zinc, manganese, copper, and cadmium toxicity. Gene 629:1–8

Fujiwara T, Kawachi M, Sato Y, Mori H, Kutsuna N, Hasezawa S, Maeshima M 2015. A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in Arabidopsis thaliana. FEBS J 282:1965–1979

Gill SS, Hasanuzzaman M, Nahar K, Macovei A, Tuteja N 2013. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem 63:254–261

Guo A, Zhu Q, Chen X, Luo J 2007. GSDS: a gene structure display server. Yi Chuan= Hereditas, 29(8): 1023-1026.

Gustin JL, Zanis MJ, Salt DE (2011) Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. BMC Evol Biol 11:76

Kolaj-Robin O, Russell D, Hayes KA, Pembroke JT, Soulimane T 2015. Cation diffusion facilitator family: structure and function. FEBS Lett 589:1283–1295

Li, J., Jiao, Z., He, R., Sun, Y., Xu, Q., Zhang, J., ... & Niu, J 2019. Gene Expression Profiles and microRNA Regulation Networks in Tiller Primordia, Stem Tips, and Young Spikes of Wheat Guomai 301. *Genes*, *10*(9), 686.

Menguer PK, Farthing E, Peaston KA, Ricachenevsky FK, Fett JP, Williams LE 2013. Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1. J Exp Bot 64:2871–2883

Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M (2007) Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. BMC Genom 8:107

Ricachenevsky FK, Menguer PK, Sperotto RA, Williams LE, Fett JP 2013. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. Front Plant Sci 4:144

Shahzad Z, Gosti F, Frérot H, Lacombe E, Roosens N, SaumitouLaprade P, Berthomieu P 2010. The five AhMTP1 zinc transporters undergo different evolutionary fates towards adaptive evolution to zinc tolerance in Arabidopsis halleri. PLoS Genet 6:e1000911

Shirazi Z, Abedi A, Kordrostami M, Burritt DJ, Hossain MA 2019. Genome-wide identification and characterization of the metal tolerance protein (MTP) family in grape (Vitis vinifera L.). 3 Biotech, 9(5), 199.

Thomine S, Vert G 2013. Iron transport in plants: better be safe than sorry. Curr Opin Plant Biol 16:322–327

Ueno D ve ark., 2015. A polarly localized transporter for efficient manganese uptake in rice. Nat Plants 1:15170

Vatansever R, Filiz E, Eroglu S 2017. Genome-wide exploration of metal tolerance protein (MTP) genes in common wheat (Triticum aestivum): insights into metal homeostasis and biofortification. Biometals 30:217–235

Voorrips RE 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. Journal of Heredity, 93(1): 77-78.

Wang C-Q, Tao W, Ping M, Z-c Li, Ling Y 2013. Quantitative trait loci for mercury tolerance in rice seedlings. Rice Sci 20:238–242

Yuan L, Yang S, Liu B, Zhang M, Wu K 2012. Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1. Plant Cell Rep 31:67–79

# *Phaseolus vulgaris*'te süperoksit dismutaz (SOD) genlerinin genom bazında analizi

Özlem Bakır[1*], Aybüke Okay[2], İlker Büyük[3], Sümer ARAS[4]

[*1]Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Bartın, Türkiye.
[2,3,4]Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye.

*Corresponding author e-mail: obakir@bartin.edu.tr

**Özet**

Süperoksit dismutaz (SOD), bitkilerde olumsuz çevre koşullarının neden olduğu oksidatif strese karşı cevapta rol oynayan önemli bir enzimatik antioksidandır. Günümüze dek pek çok bitki türünde çalışılmış olmasına rağmen, *Phaseolus vulgaris*'te SOD gen ailesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Literatürdeki bu eksiklikten yola çıkarak planlanan bu çalışmanın amacı SOD gen ailesinin üyelerinin *Phaseolus vulgaris* bitkisinde in siliko olarak genom çapında belirlenmesi ve karakterize edilmesidir. Bu kapsamda fasulye genomunda 8 adet SOD proteini tespit edilmiş olup bu proteinleri kodlayan SOD genlerinin 3, 4, 6, 7 ve 9 numaralı kromozomlarında yerleşik olduğu belirlenmiştir. Moleküler ağırlıkları 15.18 ile 35.66 kDa arasında değişen PhvulSOD proteinleri 152-312 arasında değişen sayıda amino asitten oluşmaktadır. İzoelektrik noktaları ise 5.17 (Phvul-SOD-2) ile 7.93 (Phvul-SOD-5) arasındadır. PhvulSOD genlerinin ekzon-intron yerleşimlerine bakıldığında en fazla sayıda intronun, aralarında tandem duplikasyon bulunan PhvulSOD-4 ve PhvulSOD-5 genleri arasında olduğu görülmüştür. PhvulSOD genlerinin korunmuş bölge yapılarının evrimsel süreçteki durumlarını aydınlatmak için yapılan filogenetik analizler sonucunda 3 farklı grupta kümelendiği tespit edilmiştir. SOD genlerinin ifade profilleri bu genlerin farklı dokularda ifade olduğunu ortaya çıkarmış ve bu genlerin bitkinin gelişimi süresince çeşitli fizyolojik işlevlerde görev aldıklarını göstermiştir. Ek olarak, tanımlanan SOD genlerinin promotor bölgelerinde farklı stres türleri ile ilişkili çok sayıda cis elementi saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların fasulyede SOD gen ailesi üzerine ileride gerçekleştirilebilecek fonksiyonel araştırmalar için faydalı olabileceği görüşündeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Stres, In siliko analiz, *Phaseolus vulgaris*, SOD, biyoinformatik

## Genome-wide analysis of superoxide dismutase (SOD) genes in *Phaseolus vulgaris*

**Abstract**

Superoxide dismutase (SOD) is an important enzymatic antioxidant that plays a role in response to oxidative stress caused by adverse environmental conditions in plants. Although many plant species have been studied to date, little is known about the SOD gene family in *Phaseolus vulgaris*. The aim of this study, which is planned based on this deficiency in the literature, is to identify and characterize the members of the SOD gene family in the genome-wide genome in the *Phaseolus vulgaris* plant. In this context, 8 SOD proteins have been identified in the bean genome, and it has been determined that the SOD genes encoding these proteins are located on chromosomes 3, 4, 6, 7 and 9. PhvulSOD proteins, whose molecular weights range from 15.18 to 35.66 kDa, consist of a number of amino acids ranging from 152-312. The isoelectric points are between 5.17 (Phvul-SOD-2) and 7.93 (Phvul-SOD-5). When the exon-intron placements of the PhvulSOD genes are examined, it was seen that the highest number of introns are between the PhvulSOD-4 and PhvulSOD-5 genes with tandem duplication. PhvulSOD genes have been clustered in 3 different groups as a result of phylogenetic analysis to illuminate the status of protected zone structures in the evolutionary process. The expression profiles of SOD genes revealed that these genes were expressed in different tissues and showed that these genes were involved in various physiological functions during the development of the plant. In addition, a large number of cis elements associated with different types of stress have been identified in the promoter regions of the identified SOD genes. We believe that the results obtained from this study may be useful for future functional research on the SOD gene family in beans.

**Keywords:** Abiotic stress, Genome-wide identification, In silico analysis, *Phaseolus vulgaris*

## GİRİŞ

Bitkiler; kuraklık, sıcaklık, ışık şiddeti, ağır metal ve besin eksikliği gibi doğal nedenlerden veya insan aktivitelerinden kaynaklanabilen farklı stres faktörlerine maruz kalırlar (Arora *et al.* 2002). Bitkiler biyotik ve abiyotik stresler karşısında hayatta kalabilmek için hücresel, fizyolojik ve moleküler seviyede tepki verirler.

Stres koşulları altında ilk önce bitkilerde aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi meydana gelir (Akram *et al.* 2017). ROT oluştuktan sonra stres algılanır ve sonra hücresel bir sinyal iletim yolu uyarılmaktadır. Stres koşulları altında ROT'ların üretimleri önemli ölçüde artar. Bitkilerde ROT'un aşırı üretilmesi, hücre zarının ve homeostazının bozulmasına, DNA iplikçik kırılmasına, proteinlerin bir araya getirilmesine veya hücre ölümünü tetikleyebilecek fotosentetik pigmentlerin hasar görmesine neden olabilir (Gomes *et al.* 2017). Serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltmak için bitki hücreleri, SOD (Süperoksit dismutaz), CAT(katalaz) , askorbat peroksidaz (APX), GPX ve glutatyon redüktaz gibi enzimatik antioksidanlardan ve askorbat (AsA), glutatyon(GSH), karotenoidler, alkaloidler, tokoferoller, prolin ve fenolik bileşikler (flavonoidler, tanenler ve lignin) gibi nonenzimatik antioksidanlardan oluşan antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirirler (Emamverdian *et al.* 2015).Süperoksit dismutaz (SOD; E.C.1.15.1.1) enzimi, süperoksit radikalinin $H_2O_2$ ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metal içeren bir enzimdir (Sairam ve Srivastava 2000). ROT'lara karşı antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olan ve bütün aerobik organizmalarda bulunan bu enzimlerin çeşitli streslere cevap olarak arttığı ve bu artışın bitkiye direnç sağladığı belirlenmiştir (Apel ve Hirt 2004). SOD, katalitik bölgedeki farklı metal kofaktörlerine göre dört türe ayrılmaktadır: Cu / Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD ve Ni-SOD (Abreu ve Cabelli, 2010; Whittaker, 2010). Fe-SOD ve Mn-SOD esas olarak daha düşük bitkilerde bulunurken Cu / Zn-SOD daha yüksek bitkilerde bulunur (Xia ve ark., 2015). Ni-SOD *Streptomyces*'te, siyanobakterilerde bulunur (Kim ve ark., 1996; Wuerges ve ark., 2004; Dupont ve ark., 2010). Fe-SOD kloroplastta; Mn-SOD mitokondri ve peroksizomlarda; Cu / Zn-SOD esas olarak kloroplastlarda ve sitoplazmada, Ni-SOD ise sitoplazmada yer almaktadır (Youn ve ark., 1996; Dupont ve ark., 2010).Bu SOD'lar hücrenin farklı bölgelerine dağılmıştır ve oksidatif strese yanıt mekanizmasında anahtar rol oynamaktadır. Şimdiye kadar, yüksek verimli sekanslama teknolojilerinin geliştirilmesiyle, *Arabidopsis thaliana, Dimocarpus longan, Sorgum bicolor, Populus trichocarpa, Musa aküminat, Gossypium raimondii, Gossypium arboreum* ve *Gossypium hirsutum* dahil olmak üzere birçok bitki türünde SOD gen aileleri genom çapında tanımlanmıştır (Hu ve ark., 2019).Birçok çalışma, bitki SOD genlerinin ekspresyonunun çeşitli çevresel stres faktörlerinden etkilendiğini ve farklı çevresel koşullarınında SOD gen ekspresyonunda farklılıklara yol açtığını göstermiştir (Xia ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2016c). *A. thaliana* oksidatif strese maruz kaldıktan sonra SOD genlerinin transkripsiyon ve translasyon seviyelerinde önemli ölçüde artış gözlenmiştir; kuraklık stresi altında *G. hirsutum'da*, üç tip SOD geninin ifadesi önemli ölçüde up regüle olduğu; ama soğuk stresi altında sadece CSD genlerinin ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Jiang ve ark., 2019).*Oryza sativa* (Lin ve ark., 2009) ve *Pisum sativum*'da (Yan ve ark., 2009) SOD aktivitesinin tuz stresi altında arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar bitkilerdeki SOD aktivitesinin çeşitli stres faktörlerine karşı bitki direncini artırabileceğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı SOD gen ailesi üyelerinin fasulye genomunda ilk kez in siliko yöntemler kullanarak genom çaplı olarak belirlenmesidir. Bu çalışmada, SOD gen ailesinin filogenetik ilişkilerini, genom içindeki dağılımı, gen yapı düzenini, motiflerin kompozisyonunu, farklı dokulardaki ekspresyon profilleri karakterize edilmiştir. Fasulye SOD gen ailesinin tanımlanması ve fonksiyonel analizi, fasulye genomundaki biyotik ve abiyotik streslere toleransın genetik mekanizmasının daha iyi anlaşılması için bir temel sağlamaktadır.

## MATERYAL ve METOT

### Fasulye genomunda SOD genlerinin belirlenmesi

Fasulye genomundaki SOD gen ailesinin protein dizileri Pfam (http://pfam.xfam.org/) veritabanından elde edilen Pfam Erişim Numarası (PF00080, PF00081, and PF02777) kullanılarak Phytozome veritabanı v12.1 (http:// www.phytozome.net) 'dan elde edilmiştir. Fasulye genomundaki tüm muhtemel SOD genlerini belirlemek için, hem Phytozome veritabanın v12.1'deki blastp hem de gizli Markov model (HMM) (http://www.ebi.ac.uk) araması varsayılan parametrelerle *Phaseolus vulgaris* genomunda taranmıştır. İlişkili olmayan diziler "decrease redundancy aracı" (http://web.expas y.org/decrease_redundancy/) kullanılarak elde edilmiştir. İlişkili dizilerdeki SOD domaininin varlığı HMMER (http://www.ebi.ac.uk) veritabanı kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen SOD proteinlerinin moleküler ağırlığı ve teorik izoelektrik noktası (pI) "ProtParam aracı" (http://web.expasy.org/protp aram) kullanılarak belirlenmiştir.

### SOD genlerinin yapısı, fiziksel yerleri, gen duplikasyonları ve korunmuş motiflerinin belirlenmesi

SOD proteinlerinin ekzon-intron bölgeleri hakkında bilgi edinmek için, Gene Structure Display Server v2.0 kullanılmıştır (GSDS, http://gsds.cbi.pku.edu.cn/). Hem genom dizileri hem de kodlanan DNA (CDS) dizileri SOD genlerinin pozisyon bilgisini tahmin etmede kullanılmıştır. Phytozome veritabanı v12.1 kullanılarak, SOD genlerinin kromozomal yerleri ve büyüklükleri belirlenmiştir. SOD genleri tüm *P.vulgaris* kromozomlarına işaretlenmiş ve MapChart programı ile çizilmiştir (Voorrips, 2002). Gen duplikasyon olayları "Bitki Genom Katlanma Veritabanı, BGKV" sağlayıcısı http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/) kullanılarak belirlenmiştir. SOD genlerinin ikili çiftleri arasındaki Non-sinonim oranları (Ka), sinonim oranları (Ks) ve evrimsel zorlamalar (Ka/Ks) PAL2NAL (http://www.bork.embl.de/pal2nal) programı kullanılarak hesaplanmıştır. SOD proteinlerinin ilave korunmuş motiflerini belirlemek için, "Multiple EM for Motif Elicition (MEME) Aracı" (MEME v4.11.1; http://meme-suite.org/)kullanılmıştır. Minimum/maksimum genişlik ve Motiflerin maksimum sayısı için sınırlar sırasıyla 2, 50 ve 20 olarak ayarlanmıştır. Motif bölgeleri 2 ile 300 arasındadır. Bölge dağılımı tekrarların herhangi bir sayısı olarak ayarlanmıştır.

**Filogenetik analizler ve dizi hizalama**

Filogenetik analizler, 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile Neighbor-joining (NJ) metoduna göre yapılmıştır. SOD protein dizileri ClustalW kullanılarak hizalanmıştır (Thompson ve ark., 1997). MEGA v7 programı kullanılarak filogenetik ağaç elde edilmiştir. Ağaç, İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) arayüzü kullanılarak şekillendirilmiştir (iTOL; http://itol.embl.de/index .shtml ).

**İn siliko gen ekspresyon analizi**

Kök_10, nodüller, kök_19, genç bakla, kök_10, kök_19, yeşil olgun tomurcuklar, yapraklar, genç triloliatlar, çiçek tomurcukları ve çiçekler de dahil olmak üzere bitkilerin özel doku kütüphanelerinde incelenen PhvulSOD genlerinin ifade seviyeleri Phytozome Veritabanı v12'den alınmıştır. İn silikodaki ekspresyon seviyeleri için FPKM (dizilen milyon baz çifti başına kilobaz transkript dizisi başına beklenen fragman sayısı) birimleri kullanılmıştır. FPKM değerleri log2 dönüştürülmüş ve heat-map haritası CIMMiner algoritması ile elde ediliştir (http://discover.nci.nih.gov/cimminer).

**Transkriptom verileri yoluyla PhvulSOD genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi**

Illumina RNA-seq verileri, PhvulSOD genlerinin ekspresyon seviyelerini ölçmek için Sekans Okuma Arşivinden (SRA) elde edilmiştir. Bu amaçla SRR957667 (yaprak-kontrol), SRR958472 (tuz ile muamele edilmiş kök), SRR958469 (kök-kontrol) ve SRR957668 (tuz ile muamele edilmiş yaprak) erişim numaraları kullanılmıştır (Hiz ve ark., 2014). Transkriptomik verilerin analizi, log2 dönüştürülmüş veriler kullanılarak Buyuk ve ark., (2016) tarafından tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, CIMMiner algoritması ile heatmap elde edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

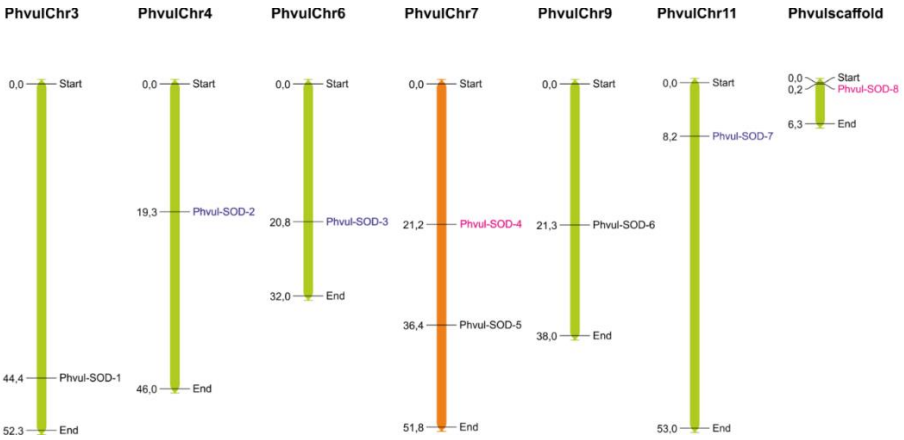
***P.vulgaris* genomundaki SOD gen ailesinin belirlenmesi**

Phytozome veritabanı v12.1'de bulunan fasulye genomunda, Pfam veritabanından elde edilen Pfam erişim numaraları (PF00080, PF00081, and PF02777) kullanılarak anahtar kelime taraması (keysearch) yapılmıştır. Bu tarama sonucunda SOD protein homolojisine sahip sekiz gen bulunmuştur. SOD domainlerinin varlığı HMMER veritabanı kullanılarak doğrulanmıştır. Ayrıca varsayılan SOD domaini içeren genlerden ilişkili olmayan diziler uzaklaştırıldıktan sonra tekrar HMMER veritabanı ile doğrulama yapılmıştır. Fasulye genomundan elde edilen sekiz aday SOD geni Tablo 1'de listelenmiştir. Önceki çalışmalarda bazı bitki türlerinde SOD genleri tanımlanmıştır; *Arabidopsis* (Kliebenstein, Monde ve Last, 1998), longan (Lin ve Lai, 2013), pirinç (Dehury ve ark., 2013; Krishna ve ark., 2014), kavak (Molina ve ark., 2013), muz (Feng ve ark., 2015), armut (Wang ve ark., 2018),domates (Feng ve ark., 2015), pamuk (Zhang ve ark., 2016a), salatalık (Zhou ve ark., 2017), soya fasulyesi (Lu ve ark.,2020), buğday (Jiang ve ark.,2019).Ayrıca bu genlerin teorik izoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları, aminoasit ve CDS dizi uzunlukları da verilmiştir. SOD genleri fasulyenin 3, 4, 6, 7 ve 9 numaralı kromozomlarında dağılmıştır. En fazla gen kromozom 7 üzerinde Phvul-SOD-4 ve 5 genleri bulunmuştur (Şekil 1). SOD proteinleri 152-312 amino asit dizisi aralığına sahip olduğu belirlenmiştir. Bunlar içerisinde en uzun aminoasit dizisine sahip olan 312 aminoasit ile Phvul-SOD-5

olmuştur. Buna karşılık olarak en kısa aminoasit dizisi 152 aminoasit ile Phvul-SOD-3'te elde edilmiştir. Yine asidikten alkaliye değişen teorik izoelektrik noktası 5.17 ile 7.93 arasındadır. En yüksek değer Phvul-SOD-2 (7.93), elde edilirken, Phvul-SOD-5 (5.17) olmuştur. Moleküler ağırlık ise 15.18 ile 35.66 kDa arasında değişiklik göstermiştir. Phvul-SOD-3 15.18 kDa olurken, Phvul-SOD-5 te ise 35.66 kDa olmuştur.

| ID | *Phaseolus vulgaris* Genomic Database Identifier | Physical position on *Phaseolus vulgaris* genome | | | Protein length (aa) | pI | Molecular weight (Da) | Instability index | Stable or unstable | Subcellular localization | Phylogeny Group | NCBI Accession No. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Chromosome | Start position (bp) | End Position (bp) | | | | | | | | |
| Phvul-SOD-1 | Phvul.003G217000 | 3 | 44,445,142 | 44,451,418 | 309 | 6.19 | 33044.41 | 39.81 | stable | chlo: 13 | I | XP_007155618.1 |
| Phvul-SOD-2 | Phvul.004G081000 | 4 | 19,287,298 | 19,295,636 | 166 | 7.93 | 17151.21 | 20.15 | stable | cyto: 9, mito: 2, cysk: 2 | II | XP_007151854.1 |
| Phvul-SOD-3 | Phvul.006G097000 | 6 | 20,757,339 | 20,760,551 | 152 | 5.59 | 15186.61 | 11.24 | stable | cyto: 14 | II | XP_007147112.1 |
| Phvul-SOD-4 | Phvul.007G135400 | 7 | 21,217,176 | 21,223,573 | 244 | 5.56 | 27472.15 | 33.67 | stable | chlo: 6, cyto: 3.5, nucl: 3, cyto_E.R.: 3 | III | AGV54680.1 |
| Phvul-SOD-5 | Phvul.007G240600 | 7 | 36,413,664 | 36,417,758 | 312 | 5.17 | 35660.87 | 39.33 | stable | chlo: 10, nucl: 1, mito: 1, extr: 1 | III | XP_007145453.1 |
| Phvul-SOD-6 | Phvul.009G141600 | 9 | 21,295,071 | 21,299,541 | 239 | 7.92 | 26575.25 | 29.61 | stable | mito: 10, chlo: 2, cyto: 1 | III | XP_007137617.1 |
| Phvul-SOD-7 | Phvul.011G086300 | 11 | 8,222,918 | 8,227,984 | 204 | 5.94 | 20786.49 | 35 | stable | chlo: 10, mito: 4 | II | XP_007132338.1 |
| Phvul-SOD-8 | Phvul.L001937 | scaffold | 197,127 | 208,963 | 262 | 7.81 | 30425.88 | 32.66 | stable | chlo: 12, nucl: 1 | III | XP_007146078.1 |

**Tablo 1.** Fasulye genomunda bulunan SOD genleri hakkında bilgi




**Şekil 1.** SOD genlerinin fasulye kromozomlarındaki dağılışı[1]

1: 7.kromozomda SOD4 ve 5 arasında tandem duplikasyon mecvut iken, diğer aynı renkte olan kromozomlarda segmental genleri göstermektedir.

Bitki türleri arasındaki SOD genlerinin sayısındaki farklılıklar, tandem ve segmental duplikasyonları içeren ve SOD genlerinin genişlemesinde önemli bir rol oynayan gen duplikasyonlarından kaynaklanabilir. Bu yüzden gen duplikasyon analiz sonuçları incelendiğinde; 6 adet segmental, 1 adet tandem duplikasyon belirlendi (Tablo 2 ve Tablo 3). SOD genlerinin gen duplikasyonları da farklı bitki türlerinde tanımlanmıştır (Zhang ve ark., 2016a).Ka/Ks oranı 1'den büyükse gen dizisinin evrimi süresince pozitif seleksiyon olduğu, 1'den küçük olması arındırıcı seleksiyon ve 1'e eşit olması ikileleşme olaylarında doğal seleksiyonu göstermektedir (Juretic ve ark., 2005).Ka/Ks oranları her biri için 1'den küçüktür bu nedenle gen dizisinin evrimi süresince arındırıcı seleksiyon olduğu görüldü.

| Gene 1 | Kro, | Gene 2 | Kro | Ks | Ka | Ka/Ks | MYÖ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Phvul-SOD-2 | 4 | Phvul-SOD-3 | 6 | 11,9125 | 0,2745 | 0,023 | 91,63 |
| Phvul-SOD-2 | 4 | Phvul-SOD-7 | 11 | 54,3943 | 1,0649 | 0,0196 | 418,41 |
| Phvul-SOD-3 | 6 | Phvul-SOD-7 | 11 | 6,1777 | 0,299 | 0,0484 | 47,52 |
| Phvul-SOD-4 | 7 | Phvul-SOD-5 | 7 | 0,5226 | 0,1704 | 0,326 | 4,02 |
| Phvul-SOD-4 | 7 | Phvul-SOD-8 | scaffold | 44,6049 | 0,4301 | 0,0096 | 343,11 |
| Phvul-SOD-5 | 7 | Phvul-SOD-8 | scaffold | 26,1916 | 0,4883 | 0,0186 | 201,47 |

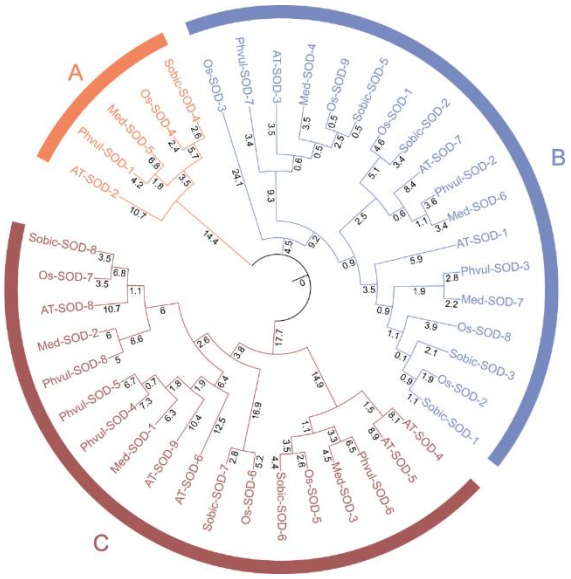
**Tablo 2.** Segmental Duplikasyon Tablosu

| Kromozom | Gen | Duplikasyon | Mesafe | Ks | Ka | Ka/Ks | MYÖ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 | Phvul-SOD-4 | Phvul-SOD-5 | 15,194,185 | 0,5226 | 0,1704 | 0,326 | 4,02 |

**Tablo 3.** Tandem Duplikasyon Tablosu

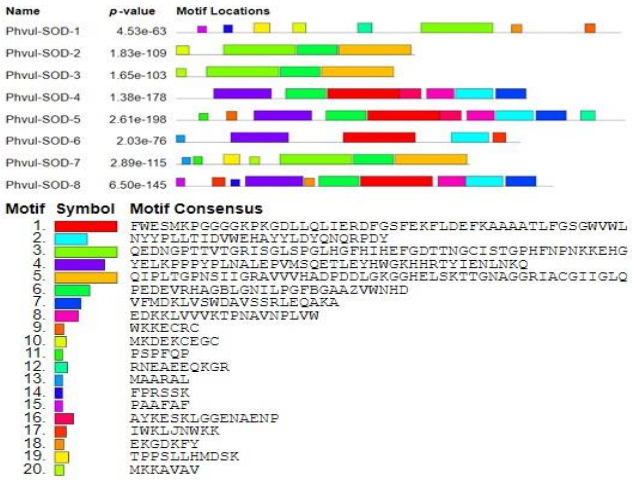
**SOD genlerinin filogenetik analizleri, korunmuş motifleri ve gen yapısı**

SOD proteinleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için *P. vulgaris*, *M. truncatula*, *Oryza sativa*, *Sorgum bicolor*, *A.thaliana* bitkilerinin SOD genleri kullanılarak filogenetik ağacı ortaya çıkarıldı. Sekanslar MEGA7'de ClustalOmega [Clustal W] ile hizalandı ve filogenetik ağaç, SOD proteinlerinin amino asit sekansına dayanan 1000 tekrarlayan bootstrap değerine sahip komşu yöntem kullanılarak çizildi (Şekil 2). Buna göre sınıflandırmada benzer bölgelerde yerleşim gösterenlerin birbirine yakın amino asit yapısına sahip olduğu ve bunun için aynı grupta yer aldığı söylenebilir.



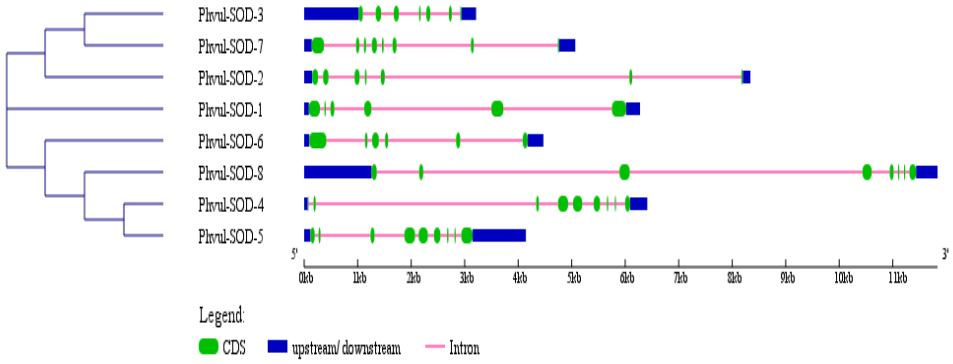

**Şekil 2.** *Phaseolus vulgaris, Medicago truncatula, Oryza sativa, Sorgum bicolor, Arabidopsis thaliana* bitkilerinin SOD proteinleri ile çizilen filogenetik ağaç

MEME (v4.12.1) (Bailey ve ark., 2006) programı kullanılarak SOD proteinlerinde yapılan korunmuş motif analizlerinde 20 korunmuş motif tespit edilmiştir. Belirlenen motiflerin uzunluğu 2 – 50 aminoasit aralığında olmuştur. En fazla motif Phvul-SOD5 ve Phvul-SOD-8 (10 motif), en az motif ise Phvul-SOD-2 ve Phvul-SOD-3 (4 motif) elde edilmiştir. Tüm SOD proteinlerinin Motif 1 ve Motif 3'ü içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 3). Aynı motifleri içeren genler, aynı gruba dâhil olup, filogenetik ağaçta aynı sınıfta bulunmaktadır. Ancak aynı motiflerin farklı gruplarda bulunabileceği de çalışmamızda gösterilmiştir. Örneğin, Motif 3'ün Phvul-SOD-1,-2 ve -3 te ortak olarak bulunduğu fakat filogenetik ağaçta Phvul-SOD-1 in Phvul-SOD-2 ve -3 ten farklı sınıflarda yer aldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, aynı motiflerin farklı grup ve filogenetik sınıflarda bulunması evrim sürecinde bunların farklı atalardan köken aldığı şeklinde yorumlanabilir.




**Şekil 3.** SOD genlerinde tahmin edilen motiflerin dağılımı

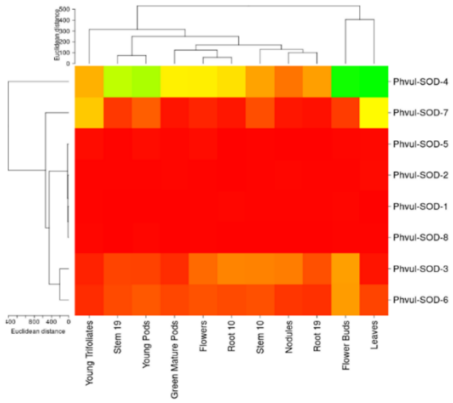
Gene Structure Display Server v2.0 ile SOD genlerinde yapılan yapısal analiz sonucunda ekzon ve intron sayıları belirlemiştir. En yüksek ekzon ve intron sayıları PhvulSOD-5 te elde edilmiştir (Şekil 4).Önceki bir çalışma, bitki SOD genlerinin yüksek oranda korunmuş intron paternlerine sahip olduğunu göstermiştir (Fink ve Scandalios, 2002).PhvulSOD gen yapılarındaki sapma, önceki bir çalışmada önerildiği gibi ekson / intron kazanımı / kaybı, eksonizasyon / psödoeksonizasyon ve insersiyon / delesyon gibi mekanizmalara bağlı olabilir (Xu ve ark., 2012). Tüm organizmalarda bulunan SOD genlerinde olduğu gibi salatalık PhvulSOD genleri de intron-ekzon sayı ve durumlarına göre filogenetik ağaçta benzer sınıflarda yer almıştır. Bu sonuç, tüm SOD genleri arasında evrimsel açıdan korunmuş bir ilişkinin varolabileceğini ve SOD üyelerinin benzer ekzon-intron organizasyon paternleri göstermesi çeşitli abiyotik stresleriyle ilgili benzer fonksiyonlara sahip olabileceğini düşündürmektedir.




**Şekil 4.** SOD genlerindeki ekzon ve intronların sayısı, uzunluğu ve pozisyonu

**SOD genlerinin genom çaplı ifadeleri**

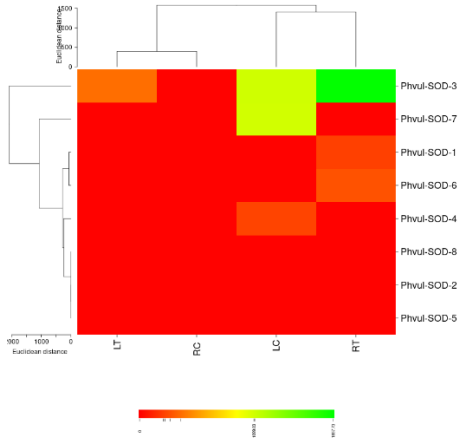
PhvulSOD genlerinin mevcut ekspresyon datalarını tespit etmek için Phytozome v12.1 online plant genomics resource kullanılmıştır. Farklı bitki dokularından 8 PhvulSOD geninin mRNA seviyelerinden türetilmiş olan heatmap oluşturulmuştur buna göre; fasulyenin farklı dokularında PhvulSOD genlerinin rolleri saptanmaya çalışılmıştır. Phvul-SOD-4'ün neredeyse bütün dokularında yüksek ekspresyon seviyeleri görülmüştür; Kök_10, nodüller, kök_19, genç bakla, kök_10, kök_19, yeşil olgun tomurcuklar, yapraklar, genç triloliatlar, çiçek tomurcukları ve çiçekler. Geri kalan PhvulSOD genlerinde ise düşük mRNA seviyeleri ortaya çıkmıştır. Phvul-SOD-1, 2, 5 ve 8'de ise herhangi bir değişim saptanmamıştır. Phvul-SOD-3, 6 ve 7'de ise düşük olsada birbirinden faklı mRNA seviyeleri oluştuğu saptanmıştır (Şekil 5).




**Şekil 5.** PhvulSOD genlerinin bitkinin farklı dokularında yapılan ifade analizi (Heatmap)

**SOD genlerinin tuz stresine cevabındaki rolü**

Mevcut SRA dataları kullanılarak PvulSOD genlerinin RNAseq analizi yapılmıştır. PvulSOD genlerinin tuz stresi koşulları altında yaprak ve kök dokularında birbirinden farklı ekspresyon seviyeleri ortaya çıktığı görülmüştür. Yaprak dokularında Pvul SOD-3, 4 ve 7'nin geninin tuz stresi altında ifade sevileri azaldığı görülmüştür. Kök dokularında ise Pvul SOD-1, 3 ve 6 genlerinin tuz stresi altında ifade seviyesinin arttığı görülmüştür (Şekil 6).




**Şekil 6.** Tuz stresi altında PhvulSOD genlerinin ifade analizi (Heatmap)

## SONUÇ

*Phaseolus vulgaris* genomunda SOD gen ailesi ile siliko olarak yapılan bu çalışmada 8 SOD üyesi tespit edilmiştir. SOD, olumsuz koşulların neden olduğu oksidatif hasara cevap vermede bitki antioksidan sisteminin önemli bir enzimidir. Fasulye bitkisinin in siliko olarak gerçekleştirilen gen ifadesi analizlerinde ise SOD genlerinin ifade farklılıkları belirlenmiştir. SOD genlerinin ifade profilleri bu genlerin farklı dokularda ifade olduğunu ortaya çıkarmış ve bitkinin gelişim süresince çeşitli fizyolojik işlevlerde görev alabildiklerini de göstermiştir. Fasulyedeki SOD gen ailesi üzerinde daha fazla fonksiyonel araştırma için bir temel sağlamaktadır. Sonuç olarak çalışmamız, SOD genlerinin fonksiyonlarının çalışılması için sonraki çalışmalara ışık tutucu niteliktedir ve farklı türlerde SOD genlerinin evriminin anlaşılmasına önemli katkılar sağlayabilir.

**KAYNAKLAR**

Abreu IA, Cabelli DE 2010. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. Biochimica et Biophysica Acta/General Subjects 1804(2):263–274

Ahmad P, Umar S, Sharma S 2010. Mechanism of free radical scavenging and role of phytohormones in plants under abiotic stresses. Plant Adaptation and Phytoremediation 2010:99–118

Akram NA, Shafiq F, Ashraf M 2017. Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. Frontiers in Plant Science, 8, 613.

Apel K, Hirt H 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol., 55: 373–399.

Buyuk I, Inal B, Ilhan E, Tanriseven M, Aras S, Erayman M 2016. Genome-wide identification of salinity responsive HSP70s in common bean. Mol Biol Rep 43:1251–1266. https ://doi.org/10.1007/s1103 3-016-4057-0

Ding FZ 2008. Research progress on application of superoxide dismutases in tobacco. Journal of Anhui Agricultural Sciences 36(5):1897–1894

Dupont CL, Neupane K, Shearer J, Palenik B 2010. Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. Environmental Microbiology 10(7):1831–1843

Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. ScientificWorldJournal, 2015: 1-18.

Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ 2017. Nitric oxide function in plant abiotic stress. Plant Cell Environ, 40(4), 462-472.

Gill SS, Tuteja N 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem, 48(12), 909-30.

Gomes MA, Hauser-Davis RA, Suzuki MS, Vitoria AP 2017. Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. Ecotoxicol Environ Saf, 140, 55-64.

Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology, 32(6), 481.

Hiz MC, Canher B, Niron H, Turet M 2014. Transcriptome analysis of salt tolerant common bean (Phaseolus vulgaris L.) under saline conditions. PLoS ONE 9:e92598. https ://doi.org/10.1371/ journ al.pone.00925 98

Hu X, Hao C, Cheng ZM, Zhong Y 2019. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the grapevine superoxide dismutase (SOD) family. *International journal of genomics*, *2019*.

Juretic N, Hoen DR, Huynh ML, Harrison PM, Bureau TE 2005. The evolutionary fate of MULE-mediated duplications of host genefragments in rice. Genome Research, 15(9): 1292-1297.

Kim EJ, Kim HP, Hah YC, Roe JH 1996. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in Streptomyces Coelicolor. European Journal of Biochemistry 241(1):178–185

Lin QB, Ding YG, Wang HB, Zhang ZQ, Mao XY, Le XY. 2009. The effects of the SOD mimics on the biomass and SOD activities of rice seedlings under salt stress. Chinese Journal of Soil Science 40(5):1163–1166

Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC 1998. Role of Antioxidant systems in wheat cultivars tolerance to water stress, Biologia Plantarum (Biol. Plant.), 41:387-394.

Song XS, Wang YJ, Mao WH, Shi K, Zhou YH, Nogués S, Yu JQ 2009. Effects of cucumber mosaic virus infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves. Physiologia Plantarum 135(3):246–257

Tepperman JM, Dunsmuir P 1990. Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. Plant Molecular Biology 14(4):501–511

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25(24): 4876-4882.

Voorrips RE 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. Journal of Heredity, 93(1): 77-78.

Whittaker JW 2010. Metal uptake by manganese superoxide dismutase. Biochimica Et Biophysica Acta Proteins and Proteomics 1804(2):298–307

Xia M, Wang W, Yuan R, Den F, Shen FF 2015. Superoxide dismutase and its research in plant stress-tolerance. Molecular Plant Breeding 13(11):2633–2646

Yan ZL, Y NJ, Xi LL, Zhou HY, Jiang J, Liu JH. 2009. Effect of soil water on protective enzyme activity and membrane lipid peroxidation in pea. Chinese Journal of EcoAgriculture 17(3):554–559

Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from Streptomyces spp. Biochemical Journal 318(3):889–896

Zhang YT, Gao JM, Zhang QL, Zhang AD, Wang HX, Sun J, Inner M. 2016c. Research progress on plant superoxide dismutase. Animal Husbandry and Feed Science 37(9):28–31

# Antibacterial and anticarcinogenic evaluation of Commercial *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale*

Ayşegül Karapınar Arif*[1], Halit Özger[1], Kerem Cansever[1], Mehtap Kara[2], Berna Özbek Çelik[3], Fatıma Nur Yılmaz[3]

*[1] Camlica MBA Schools of Science Academy
[2]Istanbul University Faculty of Pharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology.
[3] Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, 34116 Beyazit-Istanbul, Turkey

*Corresponding author e-mail: aysegularif@mbaokullari.com; mehtap.kara@istanbul.edu.tr

## Abstract

Public interst on herbal drugs increase every passing day in both developed and developing countries. However, its regulations more strict in developed countries than developing countries. Clarifying effectiveness and adverse effects of these product is becoming more important. *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* both commonly using in herbal based therapies due to the speculated antibacterial and anti-cancer effects of them. Several effects of these plants have been associated with their ingredients such as phytochemicals, flavonoids, essential oils, etc. In this study we aimed to investigate antibacterial effects and potential anticancer effects of commercial *Calendula officinali*s and *Taraxacum officinale* products that obtained from herbalist. Methanolic extracts of *Calendula officinali*s and *Taraxacum officinale* Antibacterial effects were evaluated via microbroth dilution technique using the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations. Anti-cancer effects evaluated with MTT cytotoxicity test on human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). Our results indicate that commercial products show lower antibacterial effect separately and with 1:1 combination that reported in previous different studies. It has been observed that both plant methanlic extracts were shown 100% viability in desired concentrations.

**Keywords:** Calendula officinalis, Taraxacum officinale

## INTRODUCTION

Global usage of herbal products that include nutraceuticals and herbal medicines increase rapidly fort he purpose of cure different types of diseases. Obtaining of these products is very easy in developing countries. Most people in the developing countries believed that herbal products as effective as medical cure. However, in developed countries herbal products under strict control. Eventhough these strict control protocols in developed countries, people embraced these type of remedies commonly. Due to several recent herbal drugs come into market with increasing rate, efficacity, safety and toxicity studies gain importance every passing day. Most of herbal products come into market without enough safety evaluation and people use these product by theirselfs without expert prescriptions. Misuse of herbal products cause wide range of adverse effect as allergy, liver and other target organ toxicity even death. (***Bandaranayake 2006; Ekor 2014***).

*Callendula officinalis*, (Figure 1a) include different types of phytochemicals as carotenoids, terpenoids, flavonoids, quinones etc., that used in herbal medicine fort he cure. It has been speculated that *C.officinalis* exert anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-fungal, antioxidant, hypoglycemic and gastroprotective, antidiabetic, anti-HIV and anti-cancerous effects (***Jan and John, 2017; Tonks et al., 2007).*** *C.officinalis* use for the treatment of abrasions, burns, ulcers, skin inflammations, eczema and wounds due to its anti-bacterial and anti-fungal effects. Different parts of the plant exert different effectiveness. Flower extracts Show higher antibacterial activity, however reproductive parts of plants have lesser antibacterial activity. It has been reported that, especially methanolic extract of flower include great antibacterial activity against gram negative and gram positive bacteria. (***Iauk et al., 2003)*** C.officinalis have antifungal effects on different candida species (***Jan and John, 2017***).

*Taraxacum officinale* (Figure 1b), generally used in salads and vegetable foods. T.officinale include sesquiterpenes, lactones, glycoisdes, free sterols (taraxasterol and taraxerol), polysaccharides, pectin, resin, and mucilage, and various flavonoids. T.officinale generally used for liver and kidney problems, eadema, skin problems, heartburn, and gastrointestinal problems. It has been speculated that T.officinale have Hypoglycemic effects, antyoxidant effect, diuretic, antibacterial and anti-inflammatory effects. (***Bensky et al., 2004***; ***Rasool, and Sharma 2014; Sohail et al., 2014).***

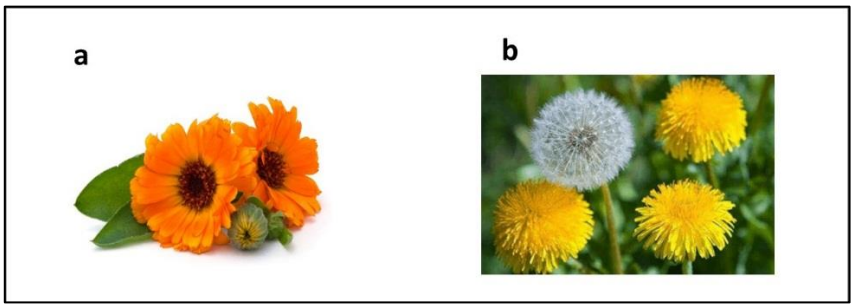



**Figure1**. a.)*Calendula officinalis*. b.) *Taraxacum officinale*. (https://www.theepochtimes.com; www.ebitki.com )

In this study we aimed to investigate antibacterial and cytotoxic effects of commercial *Calendula officinalis*, *Taraxacum officinale* products that obtained from herbalist.

## MATERIALS AND METHODS

### *Ethanolic Plant Extraction*

30 g *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* commercial plants were weighed. 300 ml ethanol was added on separately added on plants and incubated for 24h on shaker. Ethanol was vaporized by distillation equipment. Dried extracts were stored at +4 ºC.

### *Cytotoxicity Evaluation- MTT Test*

The MTT assay was performed to cytotoxic effects of the tested *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* concentrations for each plant; 100 µg/ml, 50 µg/ml 25 µg/ml 12,5 µg/ml and solvent control as DMSO (1% finally). Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells were seeded into 96-well plates ($1x10^4$ cells/100 µl of medium/well) and incubated overnight. After the treatment of *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* for 24 h, the MTT solution was added into each well and the cells were further incubated for 3 h at 37°C in the dark. After incubation the medium was discarded and 100 µl of DMSO was added to each well for dissolve formazan crystals. Optical density was measured at 570 nm by using a microplate reader (Biotek, Epoch, Vermont, USA).

### *Antibacterial Assay*

Antibacterial activity of *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* evaluated against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212ve *Candida albicans* ATCC 10231 by the microbroth dilution technique using the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations.The MIC (minimum inhibitory concentration) values were determined by comparison with standard agents. (***CLSI; 2015)***

## RESULTS

### *Cytotoxicity Assay*

Accoridng to MTT test results, *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* extract administration exerts 100% viability on SH-SY5Y cell lines (Table 1).

**Table 1.** Viability (%) results of *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* by MTT Test

| Calendula officinalis (µg/ml) | Viability (%) | Taraxacum officinale (µg/ml) | Viability (%) |
|---|---|---|---|
| 12,5 | 100 | 12,5 | 100 |
| 25 | 100 | 25 | 100 |
| 50 | 100 | 50 | 100 |
| 100 | 100 | 100 | 100 |

### *Antibacterial Assay Results*

According to antibacterial assay result, it has been observed that ethanolic extracts of commercial *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* products exerted low antibacterial activity, addtionaly theil 1:1 combination showed very low antibacterial activity (Table 2).

**Table 2.** Antibacterial activity results

| | *Taraxacum officinale* (starting concentration: 2000 µg/ml) (µg/ml) | *Calendula officinalis* (starting concentration: 2000 µg/ml) (µg/ml) | 1:1 combination (starting concentration: 2000 µg/ml) (µg/ml) | Reference (MIC) |
|---|---|---|---|---|
| P.a. (Pseudomonas aeruginosa ) ATCC 27853 | 62,5 | 500 | 250 | Ceftazidime 2,4 |
| K.p. (Klebsiella pneumoniae) ATCC 4352 | 250 | 500 | 500 | Cefuroxime-Na 4,9 |
| E.c. (Escherichia coli) ATCC 25922 | 125 | 500 | 500 | Cefuroxime-Na 4,9 |
| E.f. (Enterococcus faecalis) ATCC 29212 | 15,6 | 250 | 125 | Cefuroxime-Na 2,4 |
| S.e. (Staphylococcus epidermidis) ATCC 12228 | 125 | 500 | 500 | Cefuroxime-Na 9,8 |
| S.a. (Staphylococcus aureus) ATCC 29213 | 62,5 | 62,5 | 125 | Cefuroxime-Na 1,2 |
| C.a. (Candida albicans) ATCC 10231 | 125 | 500 | 500 | Clotrimazole 4,9 |

MIC: minimun inhibitory concentration

## DISCUSSION

Several scientific studies on different therapeutic effects of several types of herbal drugs were published in scientific databases. Additionally several speculative information's publishing on media for different herbal drugs. People could try different plants that obtained from herbalists or they could harvest to cure themselves. In case it is very important to clarify adverse effects of herbal drugs to deliver accurate information's.

It has been reported that different calendula species have antibacterial effects on different microbes. (***Pedram et al., 2019; Efstratiou et al., 2012; Jan and John, 2017).*** In our study commercial products methanolic extract was shown lower antibacterial activity. *Taraxacum officinale's* antibacterial effects were shown in different studies. (***Lin et al., 2018; Wang, 2014***). In this study *Taraxacum officinale's* methanolic extract was shown lower antibacterial acitivy, additionally 1:1 combination of these two plants also exers lower antibacterial activity.

Several different studies focusing on anticancer effects of *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* plant extracts. (***Nassan et al., 2018 ; Nguyen et al., 2019; Saratale et al., 2018 ; Behbahani 2014).*** However in our study both of *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale's* 100 µg/ml, 50 µg/ml 25 µg/ml 12,5 µg/ml methanolic extracts concentrations administration were shown 100% viability.

## CONCLUSION

In conclusion, commercial *Calendula officinalis* and *Taraxacum officinale* products show lower antibacterial effect separately and were not shown anti-cancer effect on human neuroblastoma cell line. Further in-vivo and in-vitro studies needed to clarify antibacterial and anti-cancer effects of these plants with different extraction methods. It is very important to inform the public correctly about herbal products collection, extraction methods and therapeutic drug forms for the therapy.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study supported by Camlica MBA Schools of Science Academy.

## REFERENCES

Bandaranayake WM. 2006. "Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs,'' in Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs eds Ahmad I., Aqil F., Owais M., editors. (Weinheim:Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA; ) 25–57 10.1002/9783527609987.ch2

Behbahani M. 2014. Evaluation of in vitro anticancer activity of Ocimum basilicum, Alhagi maurorum, Calendula officinalis and their parasite Cuscuta campestris. PLoS One. 30;9(12):e116049.

Bensky D, Clavey S, Stöger E, Gamble A, 2004. Chinese Herbal Medicine Materia Medica.3rd ed. Seattle, WA: Eastland Press

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard M7-A10. Wayne, Pennsylvania.

Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR 2012. Antimicrobial activity of Calendula officinalis petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. Complement Ther Clin Pract. 18(3):173-6

Ekor M 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. Front Pharmacol. 10;4:177

http://www.ebitki.com/index.php?hq=Taraxacum%20officinale&gr=Latince

https://www.theepochtimes.com/calendula-for-lifes-cuts-and-bruises_85608.html

Iauk L, Lo-Bue A M, Milazzo I, Rapisarda A and Blandino G 2003. Antibacterial Activity of Medicinal Plant Extracts Against Periodontopathic Bacteria Phytother Res 17 599- 604

Jan, N., & John, R. 2017. Calendula officinalis-an important medicinal plant with potential biological properties. Proceedings of the Indian National Science Academy, 83(4), 769-787

Lin L, Zhu Y, Li C, Liu L, Surendhiran D, Cui H 2018. Antibacterial activity of PEO nanofibers incorporating polysaccharide from dandelion and its derivative. Carbohydr Polym. 15;198:225-232

Nassan MA, Soliman MM, Ismail SA, El-Shazly S 2018. Effect of Taraxacum officinale extract on PI3K/Akt pathway in DMBA-induced breast cancer in albino rats. Biosci Rep. 21;38(6)

Nguyen C, Mehaidli A, Baskaran K, Grewal S, Pupulin A, Ruvinov I, Scaria B, Parashar K, Vegh C, Pandey S 2019. Dandelion Root and Lemongrass Extracts Induce Apoptosis, Enhance Chemotherapeutic Efficacy, and Reduce Tumour Xenograft Growth In Vivo in Prostate Cancer. Evid Based Complement Alternat Med. 17;2019:2951428

Pedram Rad Z, Mokhtari J, Abbasi M 2019. Calendula officinalis extract/PCL/Zein/Gum arabic nanofibrous bio-composite scaffolds via suspension, two-nozzle and multilayer electrospinning for skin tissue engineering. Int J Biol Macromol. 15;135:530-543

Rasool, S., and Sharma, B 2014. Taraxacum officinale: A high value less known medicinal plant. Ann Plant Sci, 3, 908-915

Saratale RG, Benelli G, Kumar G, Kim DS, Saratale GD 2018. Bio-fabrication of silver nanoparticles using the leaf extract of an ancient herbal medicine, dandelion (Taraxacum officinale), evaluation of their antioxidant, anticancer potential, and antimicrobial activity against phytopathogens. Environ Sci Pollut Res Int. 25(11):10392-10406

Sohail, M., Iqbal, Z., Afzal, M., Afzal, A., Ur Rahman, I., and Shad, S, 2014. In vitro antibacterial study of Taraxacum officinale leaves extracts against different bacterial pathogenic strains. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 3(2), 15-17

Tonks A J, Dudley E, Porter N G, Parton J, Brazier J, Simth E L and Tonks A 2007. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4 J Leukoc Biol 82 1147-55.

Wang HB 2014. Cellulase-assisted extraction and antibacterial activity of polysaccharides from the dandelion Taraxacum officinale. Carbohydr Polym. 15;103:140-2

# Farklı Kanser Hücre Hatlarında FTO Ekspresyon Seviyelerinin Western Blotlama Yöntemiyle Belirlenmesi

Aylin KANLI*, Sevinç YANAR

Tıbbi Biyoloji – Tıp Fakültesi – Kocaeli Üniversitesi – Turkey

*Sorumlu yazar e-mail: aylin.kanli@kocaeli.edu.tr

## Özet

Fat mass and obesity associated (FTO) proteini alfa-ketoglutarat bağımlı hidroksilaz ailesinin bir üyesidir ve demetilaz aktiviteye sahiptir. 2007 yılından bu yana yapılan genom ölçeğinde ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), FTO genindeki intron bölgelerine ait polimorfizmlerin obezite ve artmış vücut kitle indeksi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Bunu yanı sıra polimorfizmlerinin birçok kanser türü ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. FTO aşırı ifadesinin, bu kanser türlerinin büyümesine, kendini yenilemesine ve metastazına katkıda bulunduğu öne sürülmüştür. Bununla birlikte, bu proteinin kanser oluşumu ve ilerlemesinde rol oynadığı mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar çoğunlukla mRNA düzeyindedir ve proteomik düzeyde FTO ve kanser arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma yoktur. Bu çalışmada, farklı kanser serilerindeki FTO protein ekspresyon düzeylerinin ve bunların sağlıklı benzerlerinin western blotlama ile analiz edilmesini hedefledik. Böylelikle elde edilen sonuçlar ile FTO'nun kanser ile ilişkisini ve mekanizmasını proteomik yöntemler ile araştıracağımız daha büyük bütçeli TÜBİTAK veya BAP projeleri için ön bilgi oluşturmayı amaçladık. Meme kanser hücre hattı MDA-MB-231, akciğer kanseri hücre hattı DMS114'de ve prostat kanser hücre hatları DU145 ve 22RV hücre hatlarında FTO proteininin ekspresyonunun normal hücrelerden daha fazla olduğunu gözlemledik. Bu basit gözlem, FTO'yu çeşitli kanserlerle doğrudan ilişkilendirmek için tatmin edicidir. Bu çalışma aynı zamanda kanser hücre hatlarının FTO'nun çok işlevli rollerinin aydınlatılması için iyi modeller olduğunu göstermiştir. Kanser hücre hatlarında FTO'yu susturucu araçlar karşılaştırmalı transkriptomik, metabolomik ve proteomik çalışmalarda kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** FTO proteini, Kanser hücre hatları, Western Blotlama

# Assessment of FTO Protein Expression Levels in Various Cancer Cell Lines by Western Blotting

## Abstract

Fat-mass and obesity-associated (FTO) protein is a member of the alpha-ketoglutarate dependent hydroxylase family and has demethylase activity, genome-wide association studies (GWAS), carried out since 2007, have shown that intronic FTO gene polymorphisms are closely related to obesity and increased body mass index. In addition, many recent studies have shown an association between the FTO and various diseases e.g., cardiological and neurological diseases and various types of cancers. FTO polymorphisms are found to be closely associated with many types of cancers. FTO overexpression is proposed to contribute to the growth, self-renewal and metastasis of these cancer. However, the mechanisms by which this protein play roles in cancer formation and progression are still not fully understood. The studies conducted are mostly at the mRNA level and there are no studies investigating the association between the FTO and cancer at the proteomic level. In this study, we aimed to analyze of the FTO protein expression levels in different cancer lines and their healthy counterparts by western blotting. The data produced from this study can be used to generate comprehensive TÜBİTAK or BAP projects, in which we will investigate the relationship and mechanism of FTO with cancer by proteomic methods. We observed that FTO protein expression in breast cancer cell line MDA-MB-231, lung cancer cell line DMS114 and prostate cancer cell lines DU145 and 22RV were more than the healthy counterparts. This simple observation is satisfactory to directly associate FTO with various cancers. This study also demonstrated that cancer cell lines are good models for elucidation of multifunctional roles of FTO. Tools silencing FTO in cancer cell lines can be used in comparative transcriptomic, metabolomics and proteomics studies.

**Key words**: FTO protein, Cancer cell lines, Western Blotting

## INTRODUCTION

FTO (fat mass and obesity associated) gene is localized in the chromosomal region of 16q12.2 in humans and encodes the FTO protein of 505 amino acids (Frayling et al., 2007). The FTO protein is expressed in many vertebrate tissues, with highest levels in brain and pancreatic islets (Frayling et al., 2007; Sanchez-Pulido and Andrade-Navarro, 2007) and is mainly a nuclear protein and is a member of non-heme Fe(II)/2-OG-dependent oxidative DNA /RNA demethylase superfamily (Gerken et al., 2007; Sanchez-Pulido and Andrade-Navarro, 2007; Jia et al., 2008). Initial studies of the biological activity of FTO have shown that FTO is demethylate 3-meT on DNA (Gerken et al., 2007). Later studies however revealed that its main substrate was RNA rather than the DNA (Jia et al., 2008, 2011). FTO preferentially displays demethylase activity on N6-methyl adenosine ($m^6A$) of single-stranded RNA molecules in the nucleus (Jia et al., 2011). Moreover, Mauer et al. (2017) found that $m^6A_m$ in the 5-prime cap is selectively demethylated by FTO. FTO preferentially demethylates $m^6A_m$ rather than N6-methyladenosine ($m^6A$) in the cytoplasm, and reduces the stability of $m^6A_m$ mRNAs that is a dynamic and reversible epitranscriptomic modification. This methylation status of $m^6A_m$ might determines mRNA stability (Mauer et al., 2017; Wei et al., 2018).

Previous studies highlighted the clinical importance of FTO. Exonic homozygous mutations causing loss of function in the FTO gene have been found to cause serious developmental malformations (Boissel et al, 2007; Mauer et al., 2017). Several earlier genome wide association studies identified an association between common variants of the FTO gene and obesity and increased body mass index (Frayling et al., 2007; Dina C et al., 2007; Scuteri et al., 2007; Meyre et al., 2010). Subsequent large-scale genotyping studies have shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in FTO gene are associated with many diseases such as cardiologic (Liu et al., 2013; He et al., 2014) and neurological diseases (Keller et al., 2011; Reitz et al., 2012; Rivera et al.,2012) and various types of cancers (Hernandez-Caballero et al., 2015; Huang et al., 2017). In recent years, the demonstration that FTO posesses N6-methyladenosine ($m^6A$) demethylase activity draws attention to the association of this protein with cancer. $m^6A$ modifications are the most common type of modification in mammalian mRNAs and it has been recognized that they may play an important role in cancer development. Studies showing the role of FTO in cancer demonstrate that FTO polymorphisms are closely related to many types of cancer such as Acute Myeloid Leukemia (AML), breast, cervical and gastric cancers. It has been suggested that FTO contributes to the growth, self-renewal and metastasis of cancer cells as overexpressed in these cancer types (Figure 1) (Chen and Du, 2019).

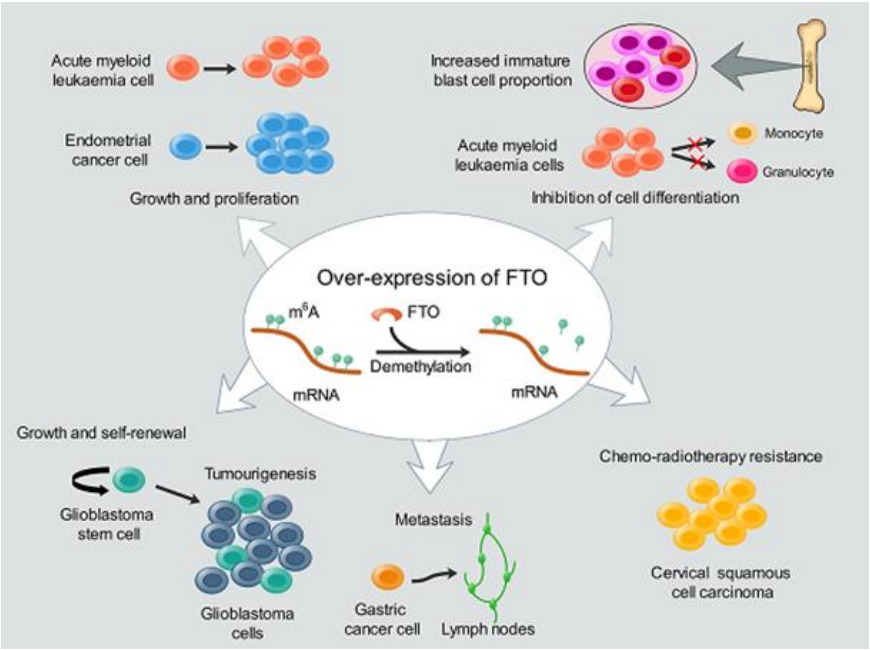



**Figure 1.** The role of FTO in tumor formation and progression. The high level of expression of FTO, $m^6A$ demethylase, contributes to the proliferation of cancer cells, tumor metastasis, chemo-radiotherapy resistance and cancer stem cell tumorigenesis (Chen & Du, 2019).

Several studies to understand the biological role (s) of FTO in cancer and tumorigenesis have shown that FTO can be an important actor. Li et al. (2017) reported that FTO acts as an oncogene by changing the expression levels of some genes such as ASB2 and RARA in their study where they investigated the biological functions of FTO. In another study conducted by Cui et al. (2017), it was reported that FTO caused tumorigenesis and resistance to treatment in glioblastoma stem cells. In a study on lung cancer, FTO has been reported to contribute to tumor development and show oncogenic properties (Liu et al, 2018). Despite the large number of epidemiological studies showing the relationship of FTO with various types of cancer, the mechanisms by which this protein plays a role in cancer formation and progression are still not fully understood. These previous studies are mostly at the mRNA level (Table 1), and there are no studies investigating the relationship between FTO and cancer at the proteomics level. In line with these results, in this study, we aimed to analyse of the FTO protein expression levels in different cancer cell lines and their healthy counterparts by western blotting in order to design proteome based studies. We observed that FTO protein expression in breast cancer cell line MDA-MB-231, lung cancer cell line DMS114 and prostate cancer cell lines DU145 and 22RV were more than the healthy counterparts. This simple observation is satisfactory to directly associate FTO with various cancers.

**Table 1.** Previous studies showing the association between FTO and cancer.

| **Cancer / Cell Types** | **The main methodological approach** | **Results** | **References** |
|---|---|---|---|
| Breast cancer patients | Epidemiological studies, SNPs. | **-** SNPs in the FTO gene increase the risk of breast cancer. | Kaklamani et al., 2011<br>Zeng et al., 2015 |
| Gastric cancer patients, *in vitro* | FTO overexpression, siRNA, WB, Q-RT-PCR, *in vitro* functional analysis | **-** FTO's overexpression has been associated with poor prognosis in gastric cancer.<br>**-** It has been suggested to play an important role in the onset and progression of gastric cancer. | Xu et al., 2017 |
| AML patients' groups, *in vitro, in vivo* | shRNA, Transcriptomics, Q-RT-PCR, WB, Transcriptomics-wide $m^6A$ and RNA-seq quantitation, gene-specific $m^6A$ quantitation, *in vitro* functional analysis, RNA stability analysis. | **-** FTO expression was found high in some subtypes of AML.<br>**-** It increases leukemic oncogene-mediated transformation and leukomogenesis.<br>**-** FTO targets genes such as ASB2 and RARA in AML. | Li et al., 2017 |
| Glioblastoma stem cells, *in vitro, in vivo* | Pharmacological inhibition, shRNA, global $m^6A$ quantitation, Q-RT-PCR, WB, *in vitro* functional analysis. | **-** $m^6A$ modifications are important in the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma cells. | Cui et al., 2017 |
| Cervical cancer patients, *in vitro, in vivo* | Gene mutation analysis (Exonseq), shRNA, global $m^6A$ quantitation. | **-** The decrease of $m^6A$ levels is associated with cervical cancer. | Wang et al., 2017 |
| Squamous cell lung cancer patients, *in vitro* | shRNA, Q-RT-PCR, WB, global $m^6A$ quantitation, *in vitro* functional analysis. | **-** Over-expression of FTO contributes to abnormal $m^6A$ modification and tumorigenesis.<br>**-** It increases the expression of the MZF1 gene by reducing the level of $m^6A$. | Liu et al., 2018 |

## MATERIAL AND METHODS

***Cell Culture.*** In this study, we used breast (MCF7, MDA-MB231), prostate (PC-3, 22RV, DU-145) and lung (A549, DMS-114) cancer cell lines and their healthy counterparts (PNT-1A-prostate, MRC5-lung). Breast and lung cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) supplemented with 10% (Vol/Vol) fetal bovine serum, 100U/mL penicillin-streptomycin and 2mM L-glutamine at 37°C in a humidified 5% $CO_2$ atmosphere as detailed in Kanli et al (Kanli et al., 2017). RPMI 1640 medium was used for prostate cancer cell lines and their healthy counterpart.

***Preparation of protein extracts.*** The cells were washed three times with ice-cold PBS and homogenized in lysis buffer (30mM Tris, 7M Urea, 2M Thiourea, 5mM Magnesium acetate, 4% [w/v] CHAPS pH 8.5), by using 0.1mm stainless steel beads in a mechanical disruption device (Bullet Blender; NextAdvance, Troy, NY). Homogenates were centrifuged at 15.000 x *g* for 30 min at 4°C to remove cell debris. Protein concentrations were determined by modified Bradford assay (BioRad, Hercules, CA) and protein extracts were aliquoted, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at −80°C. The protein extract representing the healthy breast control was gift from Dr. Murat KASAP (Yoneten et al, 2019).

***Separation of the proteins with the SDS-PAGE.*** Proteins were separated as described by Kanli et al. (2017). Equal amounts (20µg) of protein samples from each cell line were loaded into 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) to separate proteins according to their molecular weights by running with Tetra-cell gel system (BioRad).

***Staining of the Gels.*** In order to verify both the quality of the proteins and whether they are equal in quantity, the gels carried on 1D-SDS-PAGE gels were stained with colloidal Comassie blue G250 (Bio-Rad). Images of the gels were taken on the VersaDoc MP4000 (Bio-Rad) device.

***Western Blot Analysis.*** Western blot analysis was performed using anti-FTO (Clone C-3 (sc-271713), Santa Cruz, USA), and anti-beta actin (Santa Cruz, USA; ACTBD, sc-81178) antibodies as described by Guzel et al. (2017). For the purpose of band analysis, ImageJ, a freely available software was used as described by Kasap et al (2015). The software is available at the National Institutes of Health and can be downloaded from http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html. ImageJ measures the integrated density of each band by outlining it and using the Analyze/Measure command. The values obtained were plotted with Microsoft Excel software.

## RESULTS

### *Cell Culture, Preparation of protein extracts, separation of the proteins with the SDS-PAGE and staining of the Gels.*

The cells used in this study included MCF7, MDA-MB231, PC-3, 22RV, DU-145, A549, DMS-114, PNT-1A, and MRC5. The characteristics of the cell lines used in this study were summarized in Table 2. The cells were grown under sterile cell culture conditions to a density of approximately 80%, and then harvested for protein extract preparation. Protein concentrations of the samples were measured with Bradford Assay. The quality and quantity of the protein samples were verified by SDS-PAGE (12%) analysis. Equal amount of protein (20 microgram) was loaded onto each well then the gels were stained with colloidal Coomassie blue G250 (Bio-Rad). The images of the gels were captured with an imaging system (Figure 2). The gel images show that the quality of the protein samples is suitable for further studies. Analysis of the gel banding profiles revealed that there were differences among the samples. This was expected since the protein samples were prepared from different cells lines although similar *in vitro* culture conditions were used. To normalize protein concentrations among the samples, the band intensities were calculated using a common band that was present in all samples. Then western blotting studies were carried out based on the normalized protein concentrations.

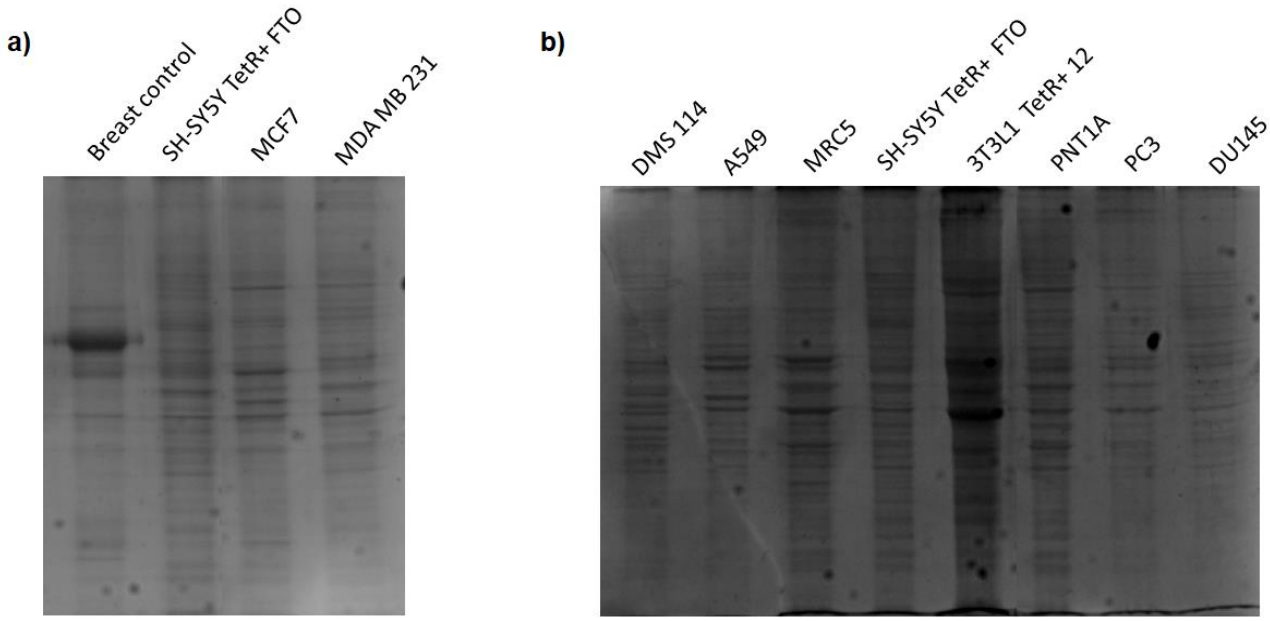



**Figure 2.** SDS-PAGE analysis of the protein samples **a)** Gel images of the protein samples obtained from breast cancer cell lines **b)** Gel images of protein samples obtained from lung and prostate cancer cell lines.

**Table 2.** Investigated cell lines and their characteristics. The data in this table was obtained from ATCC's website.

| Cell line | Cell type | Characteristics |
|---|---|---|
| **Breast** | | |
| MCF7 | Epithelial | Invasive breast ductal carcinoma<br>Oestrogen receptor + |
| MDA-MB231 | Epithelial | Adenocarcinoma<br>Epidermal growth factor (EGF) +<br>Transforming growth factor alpha (TGF alpha) + |
| **Prostate** | | |
| PC-3 | Epithelial | Grade IV, adenocarcinoma<br>High metastatic, bone metastasis<br>Prostate specific antigen - |
| 22RV | Epithelial | Carcinoma<br>Prostate specific antigen (PSA) +<br>Androgen receptor (AR) + |
| DU-145 | Epithelial | Carcinoma<br>Moderate metastatic<br>Androgen-sensitive -<br>Androgen receptor + |
| PNT-1A | Epithelial | Healthy prostate cell line |
| **Lung** | | |
| A549 | Epithelial | Carcinoma<br>Non-small cell lung cancer<br>Keratin + |
| DMS-114 | Epithelial | Carcinoma<br>Small cell lung cancer<br>Epidermal growth factor (EGF) +<br>Complement (CR3) + |
| MRC5 | Fibroblast | Healthy lung cell line |

***Determination of the differences in FTO expression among the cell lines by western blotting***

The comparative analysis of the western blots for breast cancer cell lines indicated that MDA MB231 cell line had higher level of FTO expression than MCF-7 cell line (Figure 3). Both of these cell lines were immortal cancer cell lines. To make further comparison among FTO expression levels, we included a protein extract prepared from healthy breast tissue. This sample had the highest FTO expression in comparison to the breast cancer cell lines. In addition, an exogenous FTO from SH-SY5Y were also used to assess the correct position of FTO band on the western blots. It was interesting to observe that the cell lines displayed two FTO bands which had slight molecular weight differences. This observation implied that FTO might have been post-translationally modified in these two cell lines.

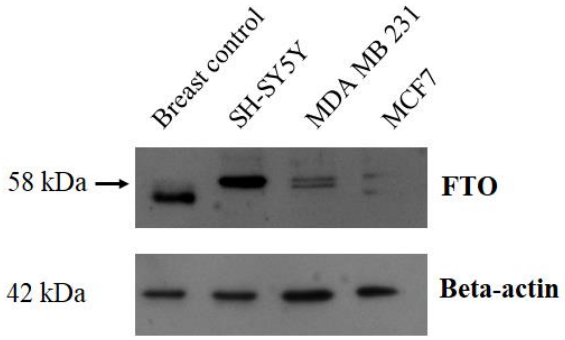



**Figure 3.** Western blot analysis of the FTO expression levels in breast cancer cell lines (Primary antibodies anti-FTO Ab 1: 1.000; anti-Actin Ab 1: 1.000; Secondary antibody anti mouse HRP 1: 20.000).

We observed that in also lung and prostate cancer cell lines FTO was expressed higher than their healthy counterparts (Figures 4 and 5). In Figure 4, band intensities are given by normalizing FTO expression levels according to Beta-actin levels in prostate cell lines. FTO expression in prostate cancer cell lines DU145 and 22RV was two-fold higher than the healthy cells. In Figure 5, band intensities are given by normalizing FTO expression levels according to Beta-actin levels in lung cell lines. We observed that lung cancer cell line DMS114 has two fold higher FTO protein expression level in compare to normal cell line.

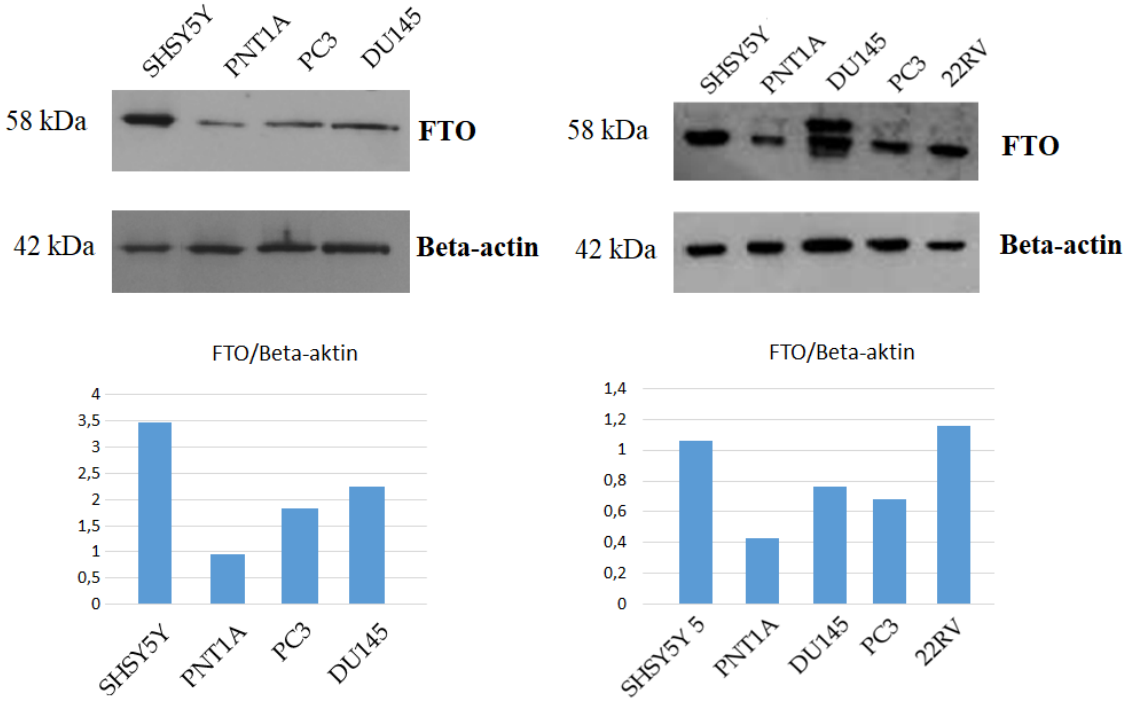



**Figure 4.** Western blot analysis of the FTO expression levels in prostate cell lines (Primary antibodies anti-FTO Ab 1: 1.000; anti-Actin Ab 1: 1.000; Secondary antibody anti mouse HRP 1: 20.000). Graphical representation of band intensities. Beta-actin normalized FTO expression levels were used in prostate cancer cell lines and their healthy counterpart.

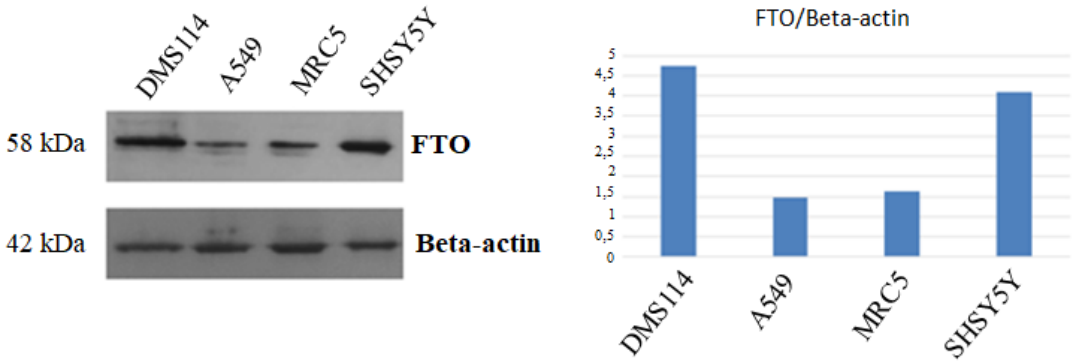



**Figure 5.** Western blot analysis of the FTO expression levels in lung cell lines (Primary antibodies anti-FTO Ab 1: 1.000; anti-Actin Ab 1: 1.000; Secondary antibody anti mouse HRP 1: 20.000). Graphical representation of band intensities. Beta-actin normalized FTO expression levels were used in prostate cancer cell lines and their healthy counterpart.

## DISCUSSION

Previous epidemiological studies have demonstrated the relationship between SNPs in the FTO gene and different metabolic diseases and cancer as well as obesity. In these studies, it has been shown that FTO is overexpressed and contributes to the growth, self-renewal and metastasis of cancer cells (Chen & Du, 2018). However, there is limited data about the role of FTO in cancer formation and progression mechanisms. There were a few studies at the time we presented the project, and these studies were mostly at the level of mRNA (Table 1). The cell lines used in these studies different from the cell lines used in our study. New studies on the association between the FTO and different cancers have been added to the literature since we started this study. Yang et al. (2019) have shown that FTO regulates melanoma growth, mediates melanoma resistance against anti-PD-1 antibody *in vitro* and *in vivo*, and the combination of the FTO inhibition with anti-PD-1 blockade may reduce resistance (Yang et al., 2019). Zhang et al. (2019) showed that the reduction of RNA $m^6A$ methylation by the effect of FTO activates the oncogenic Wnt/PI3K-Akt signal and promotes malignant phenotypes of gastric cancer cells in their study on gastric cancer cell lines (HGC-27, MKN45 and MGC803) (Zhang et al., 2019). Pilžys et al. (2019) showed the correlation between ALKBH3 and FTO expression and tumor size in head and neck cancers (Pilžys et al., 2019). Strick et al (2020) have demonstrated that ALKBH5 and FTO expression dysregulated in patients with clear cell renal carcinoma, and suggested that these may be a prognostic marker (Strick et al, 2020). In addition to these studies showing the relationship of FTO overexpression with cancer, there has also been a study showing that the under-expression of FTO is associated with cancer. Zhao et al. (2019) showed in their study on the role of FTO in hepatocellular carcinoma that lower levels of FTO mRNA were associated with clinicopathological factors. They even suggested that decreased expression in the level of FTO may be indicative of poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma, and this decline may serve as a new biomarker for hepatocellular carcinoma (Zhao et al., 2019). All these studies show that the abnormal expression of FTO clearly indicates the role of FTO on the cancer mechanism. However, these mechanisms have not been clearly explained yet. There is a need for study in different cancer cell lines.

In our study, we investigated FTO expression levels in different cancer cell lines and their healthy cell lines by western blotting and demonstrated in which cell lines FTO is overexpressed. Our findings have provided preliminary information on the possible effects of FTO on cancer progression to proteomic-based larger-scale projects (TÜBİTAK or BAP). We observed that FTO protein expression in breast cancer cell line MDA-MB-231 (EGF +, TGF alpha +), lung cancer cell line DMS114 (Small cell lung cancer) and prostate cancer cell lines DU145 (AR+, moderate metastatic) and 22RV (AR+, PSA+) were more than the healthy cells. This simple observation supports previous studies that directly link FTO with various cancers.

## CONCLUSION

Western blot analysis using cell lines and *in vitro* conditions to determine the level of moderately expressed proteins like FTO stays short in providing conclusive information. Therefore, cell lines should only be used to study functional properties of proteins which are exogenously expressed. It is our intuition that not only the cell type but also the number of passages had dramatic effects on protein profile as well as protein levels.

## ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Scientific Research Foundation of Kocaeli University. (Project Number: 2019/013-00)**.**

## REFERENCES

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 2007. 316(5826), 889-94.

Sanchez-Pulido L. and Andrade-Navarro MA. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem.* 2007. 8, 8-23.

Gerken T, Girard CA, Tung YC et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 2007. 318(5855), 1469-72.

Jia G, Yang CG, Yang S, et al. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett.* 2008 582:3313–3319. doi: 10.1016/j.febslet.2008.08.019. Epub 2008 Sep 5.

Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* 2011. **7**(12): 885–7. doi: 10.1038/nchembio.687.

Mauer J, Luo X, Blanjoie A et al. Reversible methylation of m6Am in the 5-prime cap controls mRNA **stability.** *Nature* 2017. 541: 371-375.

Wei J, Liu F, Lu Z, et al. Differential m(6)A, m(6)Am, and m(1)A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm. *Mol Cell.* 2018 71(6), 973–985.e5

Boissel S, Reish O, Proulx K, et al. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet* 2009 85 pp. 106–111

Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007 39 pp. 724–726 Epub 2007 May 13.

Scuteri A, Sanna S, Chen WM, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 2007 3, p. 115.

Meyre D, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, et al. Prevalence of loss-of-function FTO mutations in lean and obese individuals. *Diabetes*. 2010 59:311–318. doi: 10.2337/db09-0703.

Liu C, Mou S, Pan C. The FTO Gene rs9939609 Polymorphism Predicts Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2013 Aug 19;8(8):e71901.

He D, Fu M, Miao S, Hotta K, Chandak GR, Xi B. FTO gene variant and risk of hypertension: a meta-analysis of 57,464 hypertensive cases and 41,256 controls. *Metabolism.* 2014 May;63(5):633-9.

Keller L, Xu W, Wang HX, Winblad B, Fratiglioni L, Graff C. The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: a prospective cohort study. *J Alzheimers Dis* 2011 23(3):461-9

Reitz C, Tosto G, Mayeux R, Luchsinger JA. NIA-LOAD/NCRAD Family Study Group; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Genetic variants in the Fat and Obesity Associated (FTO) gene and risk of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2012 7(12):e50354.

Rivera M, Cohen-Woods S, Kapur K, et al. Depressive disorder moderates the effect of the FTO gene on body mass index. *Mol Psychiatry.* 2012 Jun;17(6):604-11. doi: 10.1038/mp.2011.45. Epub 2011 Apr 19.

Hernandez-Caballero ME, Sierra-Ramirez JA. Single nucleotide polymorphisms of the FTO gene and cancer risk: an overview. Mol Biol Rep. (2015) 42:699–704. 10.1007/s11033-014-3817-y

Huang X, Zhao J, Yang M, Li M, Zheng J. Association between FTO gene polymorphism (rs9939609 T/A) and cancer risk: a meta-analysis. Eur J Cancer Care (2017) 26. 10.1111/ecc.12464

Chen J and Du B. Novel positioning from obesity to cancer: FTO, an m6A RNA demethylase, regulates tumour progression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019. 145(1), 19-29.

Li Z, Weng H, Su R, et al. FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N6-methyladenosine RNA demethylase. *Cancer Cell.* 2017 31(1), 127-141.

Cui Q, Shi H, Ye P, et al. m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep.* 2017 18(11), 2622-2634.

Liu J, Ren D, Du Z, et al. m6A demethylase FTO facilitates tumor progression in lung squamous cell carcinoma by regulating MZF1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 Aug., 502(4), 456-464.

Kaklamani V, Yi N, Sadim M, et al. The role of the fat mass and obesity associated gene (FTO) in breast cancer risk. *BMC Med Genet.* 2011 12(1), 52.

Zeng X, Ban Z, Cao J, et al. Association of FTO Mutations with Risk and Survival of Breast Cancer in a Chinese Population. *Dis Markers*. 2015 2015,1-6.

Xu D, Shao WW, Jiang YS, et al. FTO expression is associated with the occurrence of gastric cancer and prognosis. *Oncol Rep.* 2017 38(4), 2285-2292.

Wang X, Li Z, Kong B, et al. Reduced m6A mRNA methylation is correlated with the progression of human cervical cancer. *Oncotarget,* 2017 8(58), 98918-98930

Kanli A, Kasap M, Akpinar G, Gulkac MD. Comparative analysis of glucoprotein profiles of SH-SY5Y cells stably expressing the wild type fat mass and obesity associated proteins. *TJMBB.* 2017 2:10–20.

Yoneten KK, Kasap M, Akpinar G, Gunes A, Gurel B, Utkan NZ. Comparative Proteome Analysis of Breast Cancer Tissues Highlights the Importance of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase 1 and Monoacylglycerol Lipase in Breast Cancer Metabolism. Cancer Genomics Proteomics. 2019 Sep-Oct;16(5):377-397. doi: 10.21873/cgp.20143

Guzel N, Kasap M, Kanli A, et al. Exogenous Expressions of FTO Wild-Type and R316Q Mutant Proteins Caused an Increase in HNRPK Levels in 3T3-L1 Cells as Demonstrated by DIGE Analysis. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:8216180. doi: 10.1155/2017/8216180. Epub 2017 May 7.

Kasap M, Yegenaga I, Akpinar G, et al. Comparative proteome analysis of hAT-MSCs isolated from chronic renal failure patients with differences in their bone turnover status. *PLoS ONE.* 2015 10(11), e0142934

* https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx?geo_country=tr

Yang S, Wei J, Cui YH, et al. $m_6$A mRNA demethylase FTO regulates melanoma tumorigenicity and response to anti-PD-1 blockade. *Nat Commun*. 2019 Jun 25;10(1):2782. doi: 10.1038/s41467-019-10669-0.

Zhang C, Zhang M, Ge S, et al. Reduced m6A modification predicts malignant phenotypes and augmented Wnt/PI3K-Akt signaling in gastric cancer. *Cancer Med*. 2019 Aug;8(10):4766-4781. doi: 10.1002/cam4.2360. Epub 2019 Jun 26.

Pilžys T, Marcinkowski M, Kukwa W, et al. ALKBH overexpression in head and neck cancer: potential target for novel anticancer therapy. *Sci Rep*. 2019 Sep 13;9(1):13249. doi: 10.1038/s41598-019-49550-x.

Strick A, von Hagen F, Gundert L, et al. The m6A erasers ALKBH5 and FTO are prognostic biomarkers in patients with clear cell renal carcinoma. *BJU Int.* 2020 Jan 27. doi: 10.1111/bju.15019. [Epub ahead of print]

Zhao Y, You S, Yu YQ, et al. Decreased nuclear expression of FTO in human primary hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019 Sep 1;12(9):3376-3383. eCollection 2019.

# A selective turn-off fluorescent sensor for copper (II)

Duygu Aydin*

Karamanoglu Mehmetbey University, Chemistry Department, Karaman, Turkey.

*Corresponding author e-mail: duyguaydin@kmu.edu.tr

**Abstract**

In this study, a new fluorogenic ″turn-off‟ probe ((E)-2-((4-hydroxybenzylidene) amino)-3,5-dimethoxyphenol **(BEDIM)** was synthesized and investigated the fluorescence emission responses of the **BEDIM** towards various metal ions. The probe **BEDIM** showed ratiometric changes with a "turn–off" fluorogenic sensing approach for the recognition of $Cu^{2+}$ at 518 nm under an excitation wavelength of 426 nm. The limit of detection (LOD) value of the probe **BEDIM** was recorded as $8.07\times10^{-9}$. The binding constant and possible stoichiometric ratio (2:1) values were determined by Benesi–Hildebrand and Job's plot systems, respectively. The complexation mechanism of the chemo-sensor **BEDIM**-$Cu^{2+}$ was further confirmed by FT–IR analyses. Therefore, the probe **BEDIM** could be identified to be a fluorogenic probe for the recognition of $Cu^{2+}$ in the solutions.

**Keywords:** Schiff base, $Cu^{2+}$, fluorescence probe.

## INTRODUCTION

Recently, different methods have been reported in the literature dealing with preventing toxic effects of heavy metalions such as $Cu^{2+}$ ions because excessive concentration of $Cu^{2+}$ causes toxicity and a series of disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease, Wilson's syndrome and etc (Kim and Quang 2007). Among the available methodologies, such as graphite atomic fluorescence spectrometry (AFS), flame atomic absorption spectrometry (AAS), plasmon resonance sensor, inductively coupled mass atomic emission spectrometry (ICM–AES), electrochemical assays, plasmon–resonance Rayleigh scattering spectroscopy (RSS) for the recognition of $Cu^{2+}$, fluorescent spectroscopy based monitoring techniques offers several inherent advantages for the recognition of $Cu^{2+}$ in the solutions. The technique is relatively low-cost, non-destructive analysis, quick and highly selective and sensitive (Kim et al., 2008) (Chen et al., 2012).

The aim of this work is to synthesize an original fluorogenic probe **BEDIM** and utilize it for the recognition of $Cu^{2+}$ in a mixture of $C_2H_5OH/H_2O$ (v/v, 90/10) media. The probe **BEDIM** demonstrated the selective "turn–off" fluorescence quenching at 518 nm. Furthermore, the probe **BEDIM** displayed good selectivity and high sensitivity for the recognition of $Cu^{2+}$ in the existence of other various interfering metal ions. The results showed that **BEDIM** can be employed as an efficient probe for the selective determination of $Cu^{2+}$.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and samples

All chemicals were obtained from Sigma–Aldrich Chemicals (Zwijndrecht, The Netherlands) and employed with no further depuration. A Bruker DPX 400 MHz spectrometer (Massachusetts, CA, United States) was employed to measure $^1$H–NMR spectrum. Fluorescence spectra were obtained with a Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA). The FT-IR spectra were measured utilizing on FT-IR spectrometer (Spectrum 100, Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA). Solutions of perchlorate salts of different metal ions ($Ca^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Zn^{2+}$, $Hg^{2+}$, $Al^{3+}$, $Fe^{2+}$, $K^+$, $Mn^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Co^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Pb^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Ni^{2+}$ and $Sr^{2+}$) (10 mM, in acetonitrile) were prepared as a stock solution.

### Synthesis of the probe BEDIM

An ethanolic solution (10 mL) of 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehyde (150 mg, 0.823 mmol) was mixed with 4-aminophenol (97.94 mg, 0.891 mmol) in ethanol (5 mL). After refluxing the reaction mixture for 24 h, the reaction mixture was cooled to rt. Then, the precipitated product was filtered and washed with excess water and ethanol. Subsequently, the crude product was re-crystallized from ethanol to obtain **BEDIM** as yellow crystals. The synthesis procedure of probe **BEDIM** is depicted in **Scheme 1**. Yield 82%. **Elemental Analysis:** Found: C, 64.60; H, 5.11; N, 5.35. $C_{15}H_{15}NO_4$ requires C, 65.92; H, 5.53; N, 5.13%]. **$^1$H-NMR** (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 13.97 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 6.17 – 5.89 (m, 4H), 5.19 (s, 2H), 2.95 (d, $J$ = 3.0 Hz, 6H).

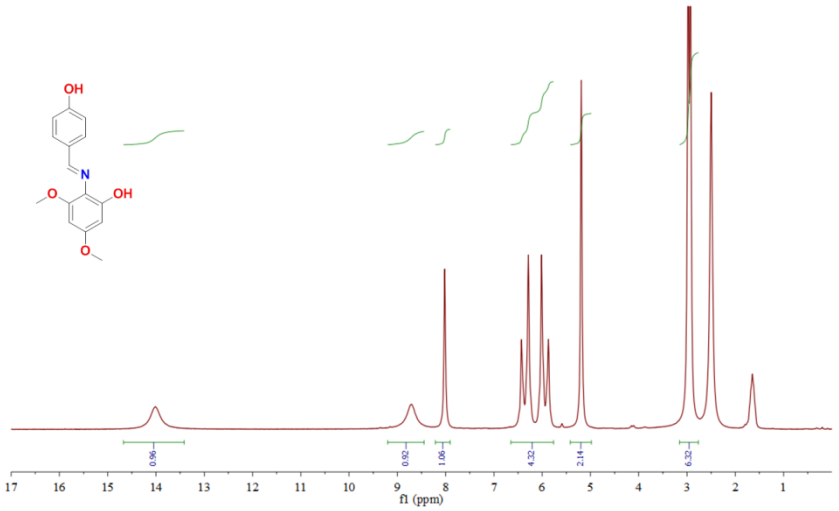
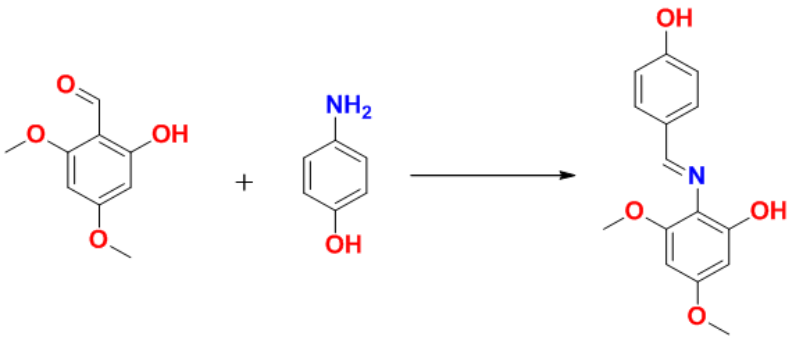



*Fig 1. $^{1}$H-NMR spectrum of the probe BEDIM.*

## RESULTS and DISCUSSION

### Synthesis of the probe BEDIM

The probe **BEDIM** was prepared by the condensation reaction of 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehyde and 4-aminophenol in ethanol with 82% yield and successfully characterized employing $^{1}$H-NMR spectrum (**Fig. 1**). The synthetic route of the probe **BEDIM** was depicted in **Scheme 1**.




*Scheme 1. The synthetic route of the probe BEDIM.*

### Fluorescent Studies

The spectral response of the probe **BEDIM** towards $Cu^{2+}$ and other wide range of metal ions ($Ca^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Zn^{2+}$, $Hg^{2+}$, $Al^{3+}$, $Fe^{2+}$, $K^{+}$, $Mn^{2+}$, $Co^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Pb^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Ni^{2+}$ and $Sr^{2+}$) in $C_2H_5OH/H_2O$ (v/v, 90/10) was explored employing the emission spectroscopy ($\lambda_{ex}$ = 426 nm, $\lambda_{em}$ = 518 nm). As illustrated in **Fig. 2a**, the free **BEDIM** (0.5 μM) solution gave a peak at 518. Although the probe **BEDIM** did not display a remarkable change in sensing behavior in the presence of other metal ions, the probe displayed the fluorescence quenching of emission band at 518 nm in the presence of $Cu^{2+}$. This remarkable quenching displays the strong affinity between **BEDIM** and $Cu^{2+}$ and the response was obtained within a very short time frame of less than 30 seconds **(Fig. 2b)**.

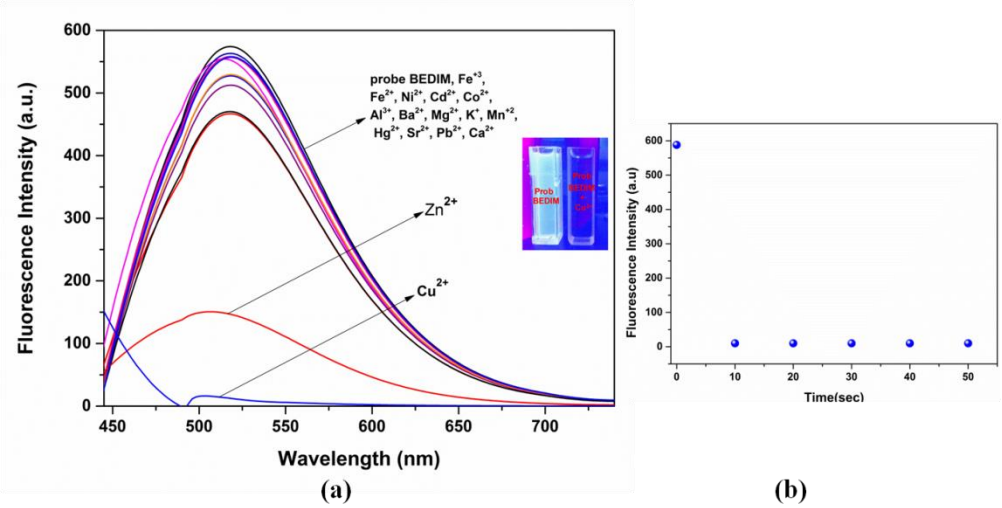



**Fig 2.** (a) Emission study of the probe **BEDIM** (0.50 μM) in presence of various metal cations (10.0 μM) and (b) Response time of **BEDIM**-$Cu^{2+}$ complex.

The sensitivity of the probe **BEDIM** toward $Cu^{2+}$ was explored through fluorescence titration experiment as depicted in **Fig**. **3a.** The intensity of the probe **BEDIM** at 518 nm gradually decreased and quenched by the addition of 5.0 equivalent of $Cu^{2+}$.

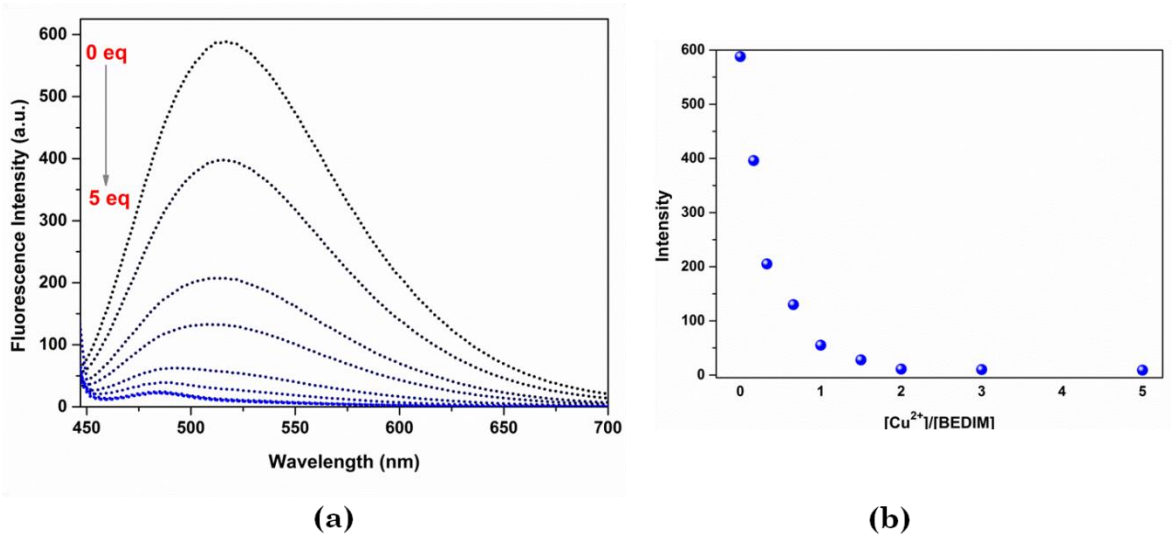



*Fig 3. (a) Spectral changes of probe BEDIM onto the $Cu^{2+}$ addition in $C_2H_5OH/H_2O$ (v/v, 90/10)($\lambda_{ex}$= 426 nm, $\lambda_{em}$= 518 nm) and (b) mol-oran ratio of BEDIM toward $Cu^{2+}$.*

Utilizing with the titration spectrum, the binding constants (Ka) for the probe **BEDIM**-$Cu^{2+}$ was determined utilizing the Benesi-Hildebrand equation (Aydin, 2020) were $7.26x10^4$ $M^{-1}$ (**Fig 4a**). Moreover, according to the formula DL=3σ/k, the detection limit of **BEDIM** toward $Cu^{2+}$ was found as $8.07\times10^{-9}$ M from a plot of the concentrations of $Cu^{2+}$ versus fluorescence intensities at 518 nm (**Fig 4b**). These results demonstrated the high sensitivity of the synthetic **BEDIM** and its potential application for the recognition of $Cu^{2+}$.

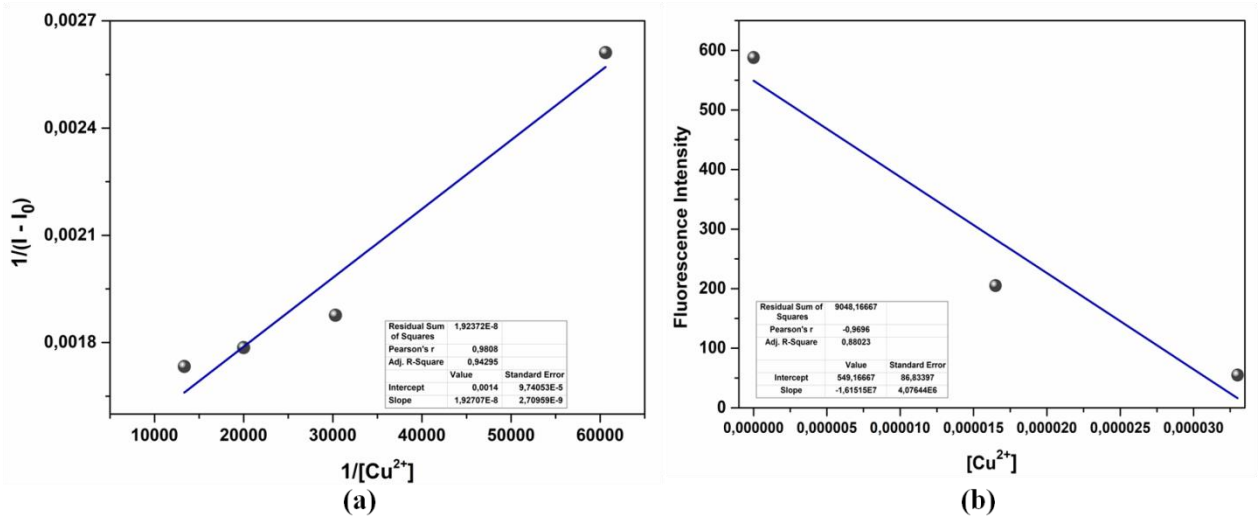



*Fig 4. Benesi–Hildebrand plot from fluorometric titration data of BEDIM (5x10$^{-5}$ M) with $Cu^{2+}$ (a) and the plots of emission intensity of BEDIM-$Cu^{2+}$ at 518 nm versus with $Cu^{2+}$ cations concentration.*

After the addition of the more than 1.0 equiv of $Cu^{2+}$, there is no change in the emission intensity. This result might prove that the binding stoichiometry of **BEDIM** to $Cu^{2+}$ was 2:1. As shown in **Fig 5a**. The maximum value of the graph was 0.66, it is easily said that a complex is formed between **BEDIM** and $Cu^{2+}$ in a mole ratio of 2:1. Additionally, **BEDIM** and **BEDIM**-$Cu^{2+}$ were analyzed with FT-IR spectroscopy. The band at 1634 cm$^{-1}$ proves the vibration of –C=N bonding of shift base and shifts to higher frequency to 1615 cm$^{-1}$. The above results display that the complexation **BEDIM**-$Cu^{2+}$ formed via -C=N group of shift base (**Fig 5b**).

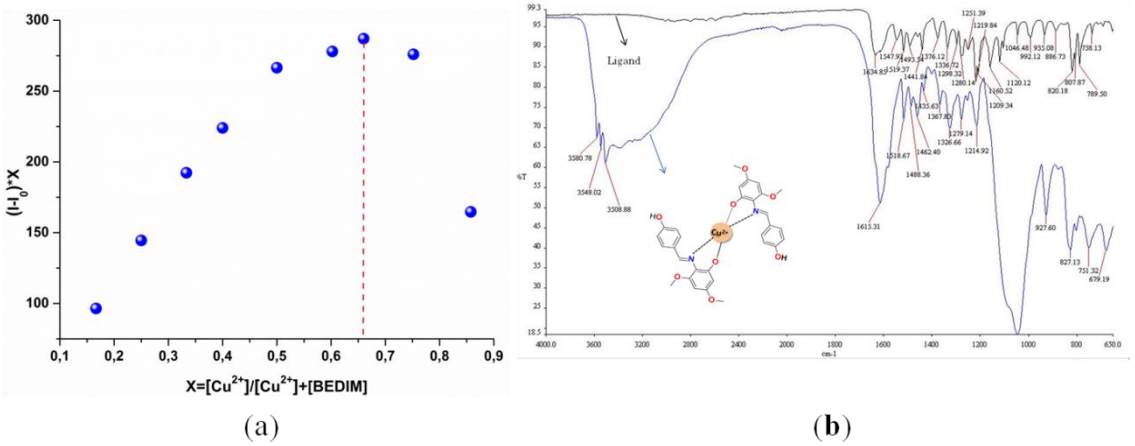



*Fig 5. (a) Job plot of BEDIM-$Cu^{2+}$ complexation and (b) FT-IR spectra of BEDIM and BEDIM-$Cu^{2+}$*

High selectivity is an important parameter for the monitoring the performance of fluorescent probes. Therefore, the competition experiment was studied to examine the binding ability of the probe **BEDIM** with $Cu^{2+}$ in the presence of various metal ions. **BEDIM** displayed high selectivity for $Cu^{2+}$ (**Fig 6**) with its fluorescence ″turn-off‟ response in the presence of other metal ions. As shown in **Fig. 6,** the results indicate that probe **BEDIM** could be utilized for the recognizing $Cu^{2+}$ with high selectivity, even if there exited in the presence of many other metal ions.

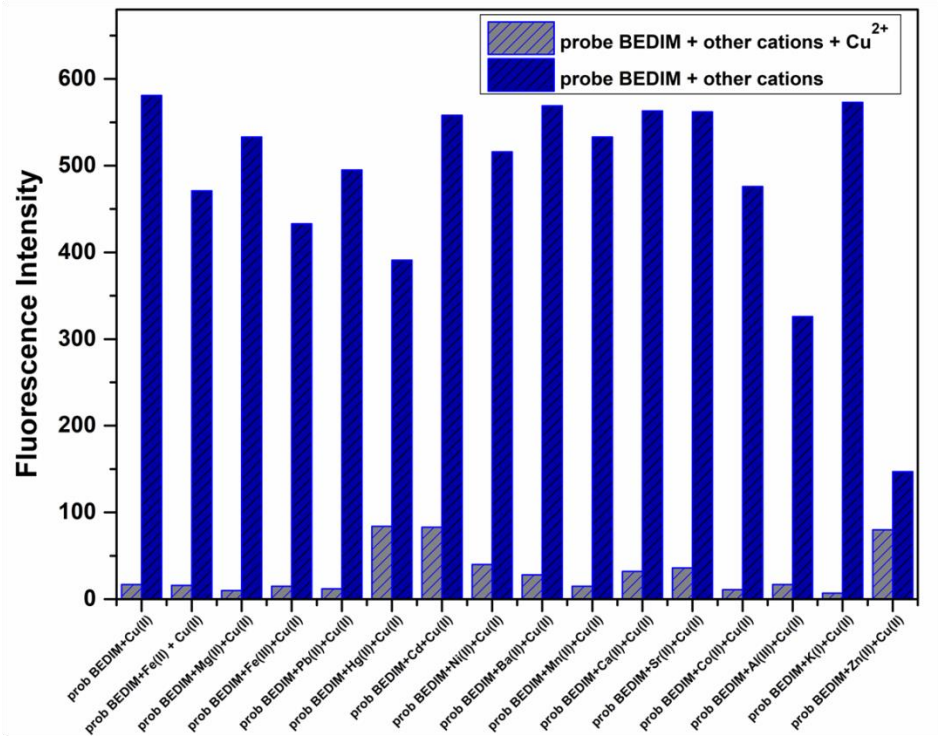



*Fig 6 Competitive selectivity of probe BEDIM toward $Cu^{2+}$ (5.0 equiv) in the presence of competing ions (5.0 equiv) in $C_2H_5OH/H_2O$ (v/v, 90/10) ($\lambda_{ex}$= 426 nm, $\lambda_{em}$= 518 nm).*

## CONCLUSION

In summary, we have designed and fabricated a highly selective and sensitive ″turn-off‟ probe **BEDIM** for the recognition of $Cu^{2+}$. The interaction of **BEDIM** with $Cu^{2+}$ resulted in the quenching of the emission intensity through a 2:1 binding modes. The binding constants of the **BEDIM**-$Cu^{2+}$ were found to be $7.26x10^4$ $M^{-1}$. The results indicated that the probe **BEDIM** could be a suitable fluorogenic sensor for the recognition of $Cu^{2+}$.

## REFERENCES

Aydin D, 2020. A novel turn on fluorescent probe for the determination of $Al^{3+}$ and $Zn^{2+}$ ions and its cells applications. Talanta, *210*, 120615.

Kim JS, Quang DT, 2007. Calixarene-derived fluorescent probes, Chem. Rev. 107, 3780-3799.

Kim HN, Lee MH, Kim HJ, Kim JS, Yoon J, 2008. A new trend in rhodamine-based chemo-sensors: Application of spirolactam ring-opening to sensing ions, Chem. Soc. Rev. 37, 1465-1472.

Chen X, Pradhan T, Wang F, Kim JS, Yoon J, 2012. Fluorescent chemo-sensors based on spiroring opening of xanthenes and related derivatives, Chem. Rev. 112, 1910-1956.

# Nutrients and Gene Interactions

Tugce Karaduman[1], Beyza Firat[1], Orhan Cicioglu[1]

[1] Biotechnology and Molecular Biology Department, Aksaray, Turkey

Corresponding author: tugce_karaduman@hotmail.com

**Abstract**

Nutrigenomics examines the interaction of nutrients with the genome, how nutrients affect metabolic pathways and gene expression. It is also an important discipline that is used to understand how food and nutritional diseases occur and to determine what went wrong during these processes. In metabolic processes in organisms, an accurate understanding of the nutrient response is first possible at the cellular level. By establishing genes, gene expression, proteins, metabolites and their relationship with the environment, 'omic' technologies are used to examine the effect of the nutrients taken as a whole. Genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic technologies and microbiota analysis provide important data for researchers to apply personalized nutrition methods. As the gene-diet interaction is better understood, appropriate nutritional prescriptions will be prepared to prevent a large number of complex and chronic problems or to reduce the symptoms of diseases. In this review, it is aimed to give information about the effects of nutrients on the organism based on nutrigenomic technologies.

***Keywords*:** Nutrient and gene interaction, nutrigenomics, epigenetics mechanisms

## 1. Introduction

Despite the genetic profile of individuals that have not changed for centuries, there have been great changes in their nutritional habits and physical activities (Simopoulos et al., 2001). These changes contributed to the emergence of new branches of science that examined genetic structure and nutrition together.

Nutrigenomics, one of the branches of science formed in this direction, is a new discipline that uses molecular techniques to understand and analyze the biological responses of certain nutrient components and/or bioactive substances after they are taken into the body. Nutrigenomic examines the nutrient-gene interaction in three areas. First, nutrients can act as a transcription factor that can bind to DNA by interacting with receptors and alter gene expression. Second, nutrients can create epigenetic interactions (such as DNA methylation and chromatin remodeling) that affect gene expression. Third, the response to diet response may vary due to genetic variations (single nucleotide polymorphism - SNP) between individuals (German et al., 2003). In other words, it depends on the same. These changes may cause cytotoxic and carcinogenic effects by causing chemical or metabolic mutations and modifications (Portela and Esteller, 2010).

Studies have revealed the relationship between the nutritional habits of individuals and gene expression changes that cause epigenetic changes (Supic et al., 2013). Understanding this relationship between nutritional habits and epigenetic mechanisms is crucial for treating many complex or chronic diseases or reducing their effects.

## 1.1.Epigenetic Mechanisms

The human genome, composed of billions of nucleotides, consists of accessible active euchromatin and less accessible inactive heterochromatin regions (Haggarty, 2006). These regions, which can include various genes, determine the transcription activity of the cell. The activity of these regions results in whether the gene associated with structural changes in chromatin is expressed, "up-regulated" or "down-regulated" (Schones, Zhao, 2005). Current studies emphasize that epigenetic mechanisms are critical for structural differences in chromatin and consequently changes in gene expression (Takahashi, 2006).

### 1.1.1. DNA Methylation

The most important and most studied type of methylation is the conversion of the cytosine base to 5-methylcytosine in some regions on DNA. The 5-methylcytosine (5-mC) modification, also called the fifth base, is generally found in 500-2000 base-pair length DNA regions, also called CpG islands, where the 5'-cytosine-phosphate-guanosine-3 'dinucleotides are frequently found. A significant number of gene promoter regions contain these CpG islands. DNA methylation can be found in other parts of the genome besides the CpG islands. The attachment of the methyl group to these regions on the DNA is carried out by enzymes called DNA methyltransferases (DNMT) consisting of 3 isoforms, DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b. While DNMT1 copies the methylation profile to newly formed cells during mitotic cell division, DNMT3a and 3b function as de novo methylase enzymes (Klose, Bird, 2006). Epigenetic marks formed as a result of methylation are not permanent but reversible. Recent studies have revealed enzymes that perform demethylation on DNA, RNA and histone proteins (Fu et al., 2014).

The recycling of DNA methylation, that is, recycling of 5-mC back into cytosine, is expressed as DNA demethylation. DNA demethylation takes place in two ways, passive and active (Shen et al., 2014). The passive mechanism is the dilution of methylated DNA with consecutive DNA replications that occur with a decrease in the activity of DNMT enzymes. The active route, on the other hand, involves reactions directly over 5-mC via enzymes and removal of the methyl group. The enzyme family (TET 1-3), consisting of 3 isoforms called TET, enzymatically restores methylated DNA (Tahiliani et al., 2009). TET enzymes oxidize the methylated DNA to 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), 5-formylcytosine and 5-carboxycytosine intermediates, respectively. The last oxidized product, 5-carboxycytosine, is converted back to normal cytosine through the thymidine glycosylase enzyme and the “base excision repair” (BER) DNA repair system. Recent studies show that these intermediate products can function as separate epigenetic markers on their own (Kohli, Zhang, 2013).

### 1.1.2. Histone Modifications

Histone modifications are another epigenetic mechanism that controls gene expression by altering the structure and functions of chromatin. This modification can take place covalently or noncovalently. Covalent histone modifications were acetylation, methylation, ubiquitination, sumoylation, phosphorylation, and S-nitrilation; In the noncovalent group, intra-chromosome or interchromosome interactions, histone swaps, chromatin repair and noncoding RNA (microRNA-miRNA, small interference RNA-siRNA) can be counted (Izmirli, 2013). Acetylation, which is often specific to active chromatin, is the most studied modification route. Acetylation increases the thrust between DNA and histone by loading negative loads on histones, which leads to relaxation of the chromatin structure (Takahashi, 2006).

### 1.1.3. RNA Modifications

In addition to chromatin shaping by DNA methylation and histone modification, noncoding RNAs (protein-free RNAs-ncRNA) are also included in epigenetic regulation. Among them, the most studied are the mRNAs that are 19-24 nucleotides in length (Takahashi, 2006). These stop gene expression by transcriptional cleavage of mRNA or translational suppression of protein expression. The most striking of the studies on the role of mRNA in epigenetic changes is the research that shows that athletic activities change the expression of methylation and mRNA of more than 197 genes (Almén et al., 2014). The genes group *RALBP1* (viral simian leukemia viral oncogene homologous A binding protein 1 / viral simian leukemia viral oncogene homolog A binding protein 1), *HDAC4* (histone deacetylase 4 / histone deacetylase 4), *NCOR2* (nuclear receptor co-repressor 2 / nuclear receptor 2), which is known to have effects on obesity formation and fat metabolism (Weihrauch et al., 2018).

### 1.1.4. Epigenetic Effects of Nutrition

Nutrition, lifestyle and environmental factors (nurture) prepare the ground for the emergence of genetic potential (Wardlaw and Smith, 2011). This potential can be conveyed not only in that individual but also in future generations, causing permanent phenotypic changes. DNA methylation is the mechanism by which foods and epigenomes are most clearly seen. Because the main source of methyl groups added to DNA in this reaction is diet (eg choline, methionine and biotin). Besides, many foods (such as folate, vitamin B12 and vitamin B6) are important cofactors in single carbon metabolism (Koban et al., 2017). Other foods that affect DNA methylation indirectly are retinoic acid and vitamin D3. A group of polyphenols, including alcohol and tea catechins, also have a strong inhibitory effect on DNA methylation and DNMT activities (Yang et al., 2008).

A large number of dietary compounds can cause the development or inhibition of cancer. These formations can be given as examples of green leafy vegetables such as folate, coffee, cereals, cinnamic acid in plum and kiwi, green tea, epigallocatechin-3-gallate, resveratrol from red grapes and its products, lignan, selenium and vitamin E from cruciferous seeds. Many dietary components have a protective effect against cancer by affecting epigenetic modification (Supic et al., 2013). These nutritional effects may be organ-specific (Khare & Verma, 2012). Polyphenols (Genistein) in soybeans suppress the expression of androgen receptors (Figure 1).

| FOOD COMPONENT | SOURCE | EPIGENETIC AND CELLULAR EFFECTS | CANCER EFFECTS |
|---|---|---|---|
| Polyphenols: Resveratrol | Grapes, peanuts | DNMT 3b inhibitor: Increase in resveratrol circulation, decrease *RASSF-1α* methylation Expression suppression of the androgen receptor | Reducing PCa and breast cancer risk |
| Folate | Perceptional folic acid supplementation; dark green leafy vegetables | Higher *IGF2* methylation in offspring Higher *HMLHI* promoter methylation | The lower birth weight associated with CRC risk |
| Zinc | Seafood, beef mutton | Zinc deficiency can initiate protein kinase B, thereby inhibiting PTEN activity and inhibiting alternative cancer associated with the inflammatory pathway | Cell reproduction inhibition in the human prostatic carcinoma cell line |
| Isothiocyanate | Cruciferous | The interaction of xenobiotic compounds with smoking and consumption of crucifer | Anti-cancer effects initiate apoptosis and suppress metastatic reproductive potential in lung cells. |

Figure 1: Epigenetic and anti-cancer effects of food ingredients (Bishop and Ferguson, 2015)

## 2. Food Gene Interaction- Nutrigenomics

The concept of gene interaction with foods is not new. The best examples are hereditary metabolism diseases. For example, in the regions of patients with phenylketonuria encoding the phenylalanine hydroxylase enzyme, it accumulates in the blood because both alleles cannot be converted to tyrosine as a result of mutation. The harm that may occur in patients can be prevented with a diet restricted from phenylalanine (Angelakis, 2004). Another example is hemochromatosis. Iron accumulates in the tissues, causing organ damage. Iron absorption increases threefold as a result of the defect in the related gene. It is treated with phlebotomy and avoiding iron supplementation (Kauwell, 2005). Thus, we can say that the role of diet is understood first in monogenic diseases and then in multifactorial diseases (Kaput and Rodriguez, 2004). Epidemiological studies have pointed out the relationship between diet and chronic diseases for a long time (Figure 2).

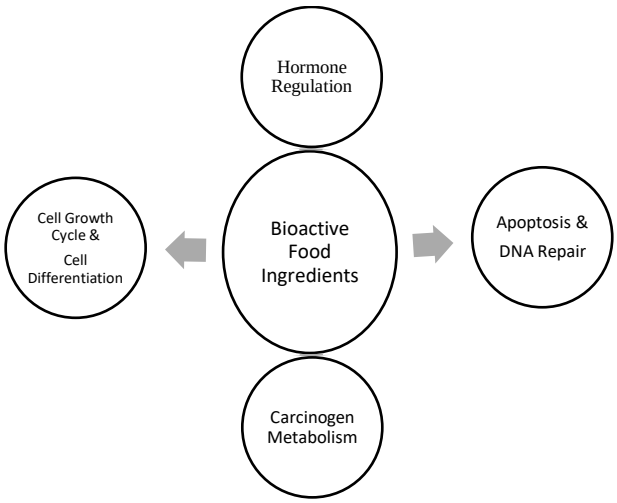



Figure 2: Bioactive nutritional components genetic and epigenetic events associated with disease formation (Coşkun, 2007)

A new scientific area has focused on the interaction of biologically active components in nutrigenomic nutrients with the genome and suggests that dietary recommendations currently in use may apply to a very small part of the population (Ferguson, 2006). For example, we know that some nutrients have increased the need for some individuals and others have decreased (Roche, 2006). It helps in developing diets that facilitate the prevention and management of nutrigenomic, genotype-dependent chronic diseases and improve health status. The main purpose of the community nutrition approach is to develop community-based approaches to create a good health condition through a healthy diet (Darnton et al., 2004).

### 2.1. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

There are 3.2 billion nucleotide base pairs in the human genome and show 99.9% similarity among individuals. “Single nucleotide polymorphisms” (SNP, called snip) are largely responsible for the 0.1% difference. SNP is the replacement of one base in the DNA sequence by another base, and such changes can be seen on 1000 bases. For a genetic variation to be characterized as SNP, it must be seen in more than 1% of the society (Kauwell, 2005). There are around 30,000 genes in the human genome. Considering that there are more than five SNPs in the 10 kb part of the genome and there are three billion base pairs in the human genome, we can say that there are more than 1.5 million SNPs. These SNPs are responsible for the different responses we give to the environment (Wang et al., 2006). This difference of 0.1% in the DNA sequence plays a role in the susceptibility of phenotypic differences (hair and skin color, height, weight) and the individual to certain diseases. In two of the three SNPs, cytosine has been replaced by thymine. It causes genetic code differences between individuals. SNPs can be located in or outside the coding regions of genes. SNPs in the coding regions

play a role in susceptibility or resistance to chronic diseases such as heart disease and diabetes. SNPs also affect drug metabolism; therefore, there are differences in response to medications and some individuals have serious side effects. The complex interaction of a large number of polymorphisms affects the responses of individuals and community subgroups to the diet approach. Based on these genetic responses, it is the main goal to be able to make individualized dietary recommendations (Willis, 2002). If our genetic structure was the same; we would expect our response to diet and medicines to be the same under the same environmental conditions. However, these responses are not the same due to SNPs (Mutch et al., 2005). Nutritional genomics aims to reveal genetic variations that are the cause of differences in the response of individuals to diets and help individuals improve their health. Heart diseases, cancer, diabetes, obesity, and phenylketonuria are examples of diseases that point to the diet-gene relationship.

### 2.2. Nutrition and Proteomics

There are more than 100,000 proteins in humans and they interact with each other (proteome). The analysis of these proteins is called proteomics, it allows to study all proteins in a cell and tissue at a certain time. Proteomics has wide applications in nutritional research. It allows scientists to identify thousands of proteins in a short time and monitor how they change due to physiological, pathological and nutritional changes. Unlike the genome, the proteome is dynamic, varies according to the cell type and the functional stage of the cell. It gives information about what changes occur in proteins after making certain dietary arrangements (Hortin et al., 2006). Proteomics examines proteins in a cell or organism at a certain period of the cell cycle and under certain environmental conditions. It illuminates the structures, placements, quantities, post-translational modifications of proteins, their functions in tissues and cells, and their interaction with other proteins and macromolecules. When considering the number of genes in the genome and post-translational changes, it is clear how many proteins are found. One of the aims of proteomics studies is to reach the markers showing the risk of disease. Other objectives include determining intracellular signal transduction pathways based on protein-protein attachment, understanding the regulation of the cell, and illuminating protein structures for new treatments to be used in disease treatment (Kauwell, 2005).

### 2.3. Nutrition and Metabolomics

The study of metabolites from lipids, carbohydrates, vitamins, hormones, and other cell components in tissues and physiological fluids in a given time is called metabolomics. It is seen as the last point in the metabolomic "omic" cascade (Dettmer & Hammock, 2004). Changes in metabolome are the organism's last response to genetic change, disease, and environmental changes. After encountering a nutrient, it gives information about all metabolites in cell and body fluids. It allows the examination of metabolic pathways using non-metabolomic invasive biological markers. As in proteomics, metabolomics aims to identify metabolites that are disease determinants or provide treatment monitoring. It allows making dietary recommendations according to the patient's metabolic profile and genetic structure (Ordovas & Corella, 2004). Individual metabolites have been used for years to diagnose the disease: blood sugar in diabetes, cholesterol levels in coronary heart disease. Metabolomic tries to determine the increases and decreases in all metabolites depending on the current situation. You can say that you may experience coronary problems when the level of cholesterol is detected, but if this information is reinforced with five different markers, for example, we can also know why we will experience this problem. We may be missing a transport protein or consuming too much oil. In other words, the metabolomic analysis does not only provide information but also makes explanations (Schmidt, 2004).

### 2.4. Nutrition and Transcriptomics

It is a simultaneous examination of mRNA transcripts that occur by transcription from the cell genome. It helps us understand how transcriptomic nutrients change gene expression throughout the genome. By developing commercial chips, what kind of metabolic changes the gene of interest can cause can be learned in a short time? It allows the understanding of disease mechanisms. For example, if the mRNA profile with high glucose

concentrations can be known, it can be understood how vascular complications such as diabetic nephropathy occur in diabetes. If those that affect global gene expression and transcriptome can be determined from nutrients and biologically active nutrient components, effective dietary approaches can be developed to prevent them (Haggarty, 2006). It is possible to examine the expression pattern of thousands of genes at once with "microarray" technology in transcriptomics. Transcriptomics studies with "Chip" technology help find new dietary response markers and screening with this technology helps us to identify nutrients with high bioactivity, harmful and toxic effects (Williams, 2003).

### 2.5. Nutrition and Microbiota

Examples of the interaction between microbiota and nutrition are butyrate metabolism, a short-chain fatty acid that strongly inhibits the enzyme histone deacetylase. One of the most important butyrate producers in the organism is *Faecalibacterium prausnitzii*, one of the Firmicutes bacteria (Paul and Barnes, 2015). Butyrate, while providing activation of p21 and BAK, which are silent tumor suppressor genes, also contributes to the structuring of microflora by changing intestinal pH (Canani et al., 2012). Except for cancer genetics, butyrate is also suggested to be related to obesity. The source of this hypothesis is that in recent studies in mice and humans, the rate of Firmicutes / Bacteroidetes increased in the flora of obese subjects (Kumar et al., 2014). Underlying this connection of Firmicutes bacteria with obesity lies the fact that most bacteria in this group are synthesizing butyrate. Butyrate has been shown to epigenetically regulate the *FFAR3* (free fatty acid receptor) promoter region from short-chain fatty acid receptors in individuals with type 2 diabetes, obese and normal weight, thereby affecting the hunger-satiety signals (Schloegl et al., 2010).

## 3. Some Food-Related Diseases

### 3.1. Cancer

Cancer, in recent years, all over the world as one of the most important public health problems in Turkey became like that. Cancer, which ranks second among the causes of death in the world, is expected to increase rapidly until 2030 and take the first place (National Cancer Control Plan, 2016). Environmental causes and genetic causes can be listed among the factors causing cancer. Among the environmental reasons, the most important factors can be smoking, consumed foods, obesity, hormones, viruses, physical and chemical agents (Harris et al., 1993). According to different sources, the relationship between cancer and nutrition varies between 10-70% and it can be accepted as an average of 35% (Anand et al., 2008). Foods have a wide spectrum ranging from cancer-protective properties to cancer-causing ones (Özkan & Çelik, 2016).

### 3.2. Hypertension

Genetic, nutritional and environmental factors (obesity, sodium, chlorine, alcohol, potassium, calcium, omega-3 fatty acids, stress, and physical activity) play a role in the development of hypertension (Visvikis & Marteau, 2006). Hypertensive patients with low plasma renin levels respond to salt restriction. There are genetic differences affecting salt response. Only half of the patients with essential hypertension have a response to salt restriction. Therefore, salt restriction is not an appropriate approach for all hypertensive patients. The angiotensinogen gene has been associated with hypertension. Angiotensin is a vasoconstrictor and is important in blood pressure control. In the angiotensinogen gene (*ANG*), which is the precursor of this, in the promoter region, guanine may have changed to arginine (G6N). Angiotensinogen levels are increased in the AA genotype and there is hypertension. Diet responses of those with AA genotype are better than the GG genotype (Kauwell, 2005). There is no response to salt restriction in the GG genotype. Threonine may replace methionine at position 235 in the gene related to angiotensin. When fiber was given in those in the TT genotype, no response was obtained in those in the TM and MM genotypes (Simopoulos, 2002).

### 3.4. Obesity

Obesity is a chronic disease caused by the energy consumed by nutrients to the body, more than the energy consumed and the body fat mass increases compared to the lean body mass. In recent years, the frequency of obesity and overweight has been increasing in many industrial countries, and this event has become a problem that affects many populations. In the developing countries of South and Central America and Southeast Asia, obesity occurs as a normal result of increased welfare and national income (Geneva, June, 1997).

#### 3.4.1. Various Factors Causing Obesity

##### 3.4.1.1. Nutritional Regulation Disorder as a Pathological Cause of Obesity

Normally, the speed of eating is regulated in proportion to the fat and carbohydrate stores in the body. In a normal person, when these stores exceed the optimal level, the feeding rate is reduced to prevent over-storage. However, this does not happen in obese people. Food intake cannot be reduced in these individuals unless they exceed body weight. This may be due to psychological factors affecting regulation or abnormalities in the regulatory system itself (Guyton & Hall, 2001).

##### 3.4.1.2. Genetic Factors in Obesity

Obesity is certainly a family-specific situation. Genes affect the degree of nutrition in various ways (Guyton & Hall, 2001). These ways are: abnormalities in the regulation of the energy store of the feeding center, abnormal and hereditary psychological factors that open appetite as a relaxation mechanism or make the person to eat and it can be listed as genetic disorders related to carbohydrate and fat storage.

Some researchers working on the genetic aspect of obesity have identified a gene (*OB* gene) that is thought to cause not only diabetes predisposition but also a tendency to become fat. In this study, it was observed that mice lacking the gene identified were fattened by showing signs of type 2 diabetes, which are closely linked to obesity and a high-fat diet, and are not satisfied with how much they eat. According to the same researchers, if there is the same gene in humans, it can be a good target not only for diabetes but also for drugs used in obesity treatment (Bouchard, 2001).

### Results

Working by preserving the natural order of your body depends on the preservation of DNA stably and gene expression does not change from unnatural sources. Epigenetics is the occurrence of different genetic variations as a result of the influence of various factors. These epigenetic changes also have hereditary properties, so they can be transferred to newly formed cells during cell division. It is evident in the light of the researches how important the role of nutrition in the epigenetic process is. As a result of human malnutrition habits, some mutations and modifications due to chemical or metabolic reasons may occur and changes in gene expression can be observed. Over-fat, low-protein, or low-calorie diet or over-calorie diet formats trigger changes in gene expression. As a result of these changes, it causes some changes in metabolism. Metabolic diseases (such as diabetes mellitus, cardiovascular diseases, obesity, hypertension, and cancer) are observed due to all these changes. In studies conducted, it has been stated that nutrition has a serious potential to create cancer risk. Also, medical nutrition therapy in cancer is always an effective and actively used method. Therefore, the right or wrong diet can be a risk factor that creates cancer on human beings, it can also be a preventive treatment method. As with cancer, more research should be done on the relationship between other diseases and nutrition and genetics. In this way, a better understanding of many gene-related diseases and the development of existing diagnosis and treatment methods will be opened in the following years.

**REFERENCES**

Almén MS, Nilsson EK, Jacobsson JA, et al. Genome-wide analysis reveals DNA methylation markers that vary with both age and obesity. Gene 2014;548(1):61-7

Anand P, Ajaikumar B, Sundaram C, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm Res 2008; 25: 2097-116.

Angelakis G. Genetics in nutrition and dietetics: a student's perspective. Top Clin Nutr 2004; 19: 308-315.

Bishop KS, Ferguson LR, 2015: The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. Nutrients, 7, 922-947.

Bouchard C. The genetics of human obesity: recent progress. Bull Mem Acad R Med Belg, 156: 455- 462, 2001.

Coşkun, Turgay. "Nütrisyonel genomik." *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 50 (2007): 47-66.

Darnton-Hill I, Margetts B, Deckelbaum R. Public health nutrition and genetics: implications for nutrition policy and promotion. Porc Nutr Soc 2004; 63: 173-185.

Dettmer K, Hammock BD. Metabolomics – a new exciting field within the "omics" sciences. Environ Health Persp 2004; 112: A396-A397.

Ferguson L. Nutrigenomics. Integrating genomic approaches into nutrition research. Mol Diag Ther 2006; 10: 101-108.

Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. Gene expression regulation mediated through reversible m(6)A RNA methylation. Nat Rev Genet 2014;15:293-306.

German JB, Roberts MA, Watkins SM. Personal metabolomics as a next generation nutritional assessment. J Nutr 2003;133:4260–66

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. İstanbul, Nobel Kitapevi, 2001:797-800.

Haggarty P, Epigenetics. In "Modern Nutrition in Health and Disease". (eds) Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ. 11th ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. 2006;534-9.

Harris JR, Morrow M, Banadonna G. Cancer of the breast. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (editors). Cancer, Principles and Prac- tice of Oncology. 4th ed, Philadelphia: JB Lippincott Co, 1993: 1264-74.

Hortin GL, Jortani SA, Ritchie JC Jr, Valdes R Jr, Chan DW. Proteomics: a new diagnostic frontier. Clin Chem 2006; 52: 1218-1222.

Izmirli M. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. Van Tıp Dergisi 2013;20(1):48-51.

Kaput J, rodriguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. Physiol Genomics 2004; 16: 166-177.

Kauwell GPA. Emerging concepts in nutrigenomics: a preview of what is to come. Nutr Clin Pract 2005; 20. 75-87.

Khare S, Verma M, 2012:Epigenetics of colon cancer. Methods Mol Biol, 863, 177-185.

Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem Sci 2006;31:89-97.

Koban, Buğu Usanma, et al. "Beslenme, diğer çevresel faktörler ve mikrobiyotanın obezite epigenetiğine etkileri." *The Journal of Turkish Family Physician* 8.4 (2017): 108-117.

Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. Nature 2013;502:472-479.

Kumar H, Lund R, Laiho A, Lundelin K, Ley RE, Isolauri E, Salminen S. Gut microbiota as an epigenetic regulator: pilot study based on wholegenome methylation analysis. MBio 2014 Dec 16;5(6):e02113-14.

Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. FASEB J 2005; 19: 1602-1616.

Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. Annu Rev Genomics Hum Genet 2004; 5: 71-118.

Özkan Ç, Çelik İ. "Beslenme ve kanser". http://www.akadgeriatri.org/ 08.03.2016.

Paul B, Barnes S, Demark-Wahnefried W, et al. Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. Clin Epigenetics. 2015 Oct16;7:112.

Portela A, Esteller M, 2010: Epigenetic modification and human disease. Nat Biotechnol, 28(10), 1057-1068.

Prevention and management of the global epidemic of obesity. Report of the WHO Consultation on Obesity (Geneva, June, 3–5, 1997). Geneva: WHO.

Roche HM. Nutrigenomics – new approaches for human nutrition research. J Sci Food Agric 2006; 86: 1156-1163.

Schloegl H, Percik R, Horstmann A, Villringer A, Stumvoll M. Peptide hormones regulating appetite–focus on neuroimaging studies in humans. Diabetes Metab Res Rev.2010; 27:104-12.

Schmidt CW. Metabolomics: what's happening downstream of DNA. Environ Health Persp 2004; 112: A411-A415.

Schones DE, Zhao K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. Nat Rev Genet 2008;9:179–91.

Shen L, Song CX, He C, Zhang Y. Mechanism and function of oxidative reversal of DNA and RNA methylation. Annu Rev Biochem 2014;83:585-614.

Simopoulos AP. Genetic variation and dietary response: nutrigenetics/nutrigenomics. Asia Pacific J Clin Nutr 2002; 11: S117-S128.

Supic G, Jagodic M, Magic Z, 2013: Epigenetics: A New Link Between Nutrition and Cancer. Nutr Cancer, 65, 781-792.

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science 2009;324:930-935.

Takahashi K. Influence of bacteria on epigenetic gene control. Cell Mol Life Sci 2014 Mar;71(6):1045-54.

Ulusal Kanser Kontrol Planı. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2013-2018 Ulusal_Kanser_Kontrol_Plani_2013_2018.pdf 8.3.2016.

Visvikis-Siest S, Marteau J-B. Genetic variants predisposing to cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol 2006; 17: 139-151.

Yang CS, Fang M, Lambert JD, Yan P, Huang TH . Reversal of hypermethylation and reactivation of genes by dietary polyphenolic compounds. Nutr Rev 2008; 66(Suppl 1):18–20.

Wang J, Li D, Dangott LJ, Wu G. Proteomics and ist role in nutrition research. J Nutr 2006; 136: 1759-1762.

Wardlaw GM, Smith AM. The Human Body; A Nutrition Perspective. In Contemporary Nutrition. (eds) Wardlaw GM, Smith AM. 8th ed. New York, McGraw-Hill. 2011;108-11.

Weihrauch-Blüher S, Richter M, Staege MS. Body weight regulation, socioeconomic status and epigenetic alterations. Metabolism. 2018 Mar 8. pii: S0026-0495(18)30072-6

Williams CM. British Nutrition Foundation Annual Lecture: Chips with everything? Nutritional genomics and the application of diet in disease prevention. Nutr Bull 2003; 28: 139-146.

Willis L. Nutrients – individualized nutrition. Experience Life Magazine September/October 2002, Volume 4, Issue 5. http://www.lifetimefitness.com/magazine/ Index.cfm?strWebAction=article_detail&intArticleI.

# The External Morphology and Histology of Malleolar Sensory System of Gylippus (Paragylippus) monoceros Werner (Solifugae, Arachnida)

Melek Erdek[1*], Selma Baran[1] , Murat Şahbaz[2]

[*1]Hakkari University, Institute of Science, Department of Biology, Hakkari, Turkey.
[2]Atatürk University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Erzurum, Turkey.

*Corresponding author e-mail: melekerdek@hakkari.edu.tr

## Abstract

Solifuges possess malleoli (racquet organs) on the ventral surface of forth pair of legs as distinctive anatomical structures. The detail external morphology and histology of the malleoli in male gylippid, *Gylippus (Paragylippus) monoceros* Werner, performed using Light microscopy and Scanning electron microscopy (SEM) techniques. Each malleolus comprises of two parts; malleolar stalk and malleolar fan. The protuberances on malleolar stalk and Anterior, posterior ridges and sensory groove were shown on the front side of malleolar fan of each malleolus using SEM. The inner dendritic segment, malleolar ganglion and epithelium parts were shown on the longitudinal section of a malleolus using light microscope. Malleolar sensory system functions as chemoreceptor by contacting the ground while walking via sensory groove and mechanoreceptor by microtrichia.

**Keywords:** *Gylippus*, Solifugae, Malleoli, Morphology, Histology

## INTRODUCTION

Solifuges possess highly specialized characteristic fan-shaped sense organs, malleoli (racquet organs), on the ventral surface of the forth pair of legs. Each 4th leg has two malleoli on coxa, two on proximal trochanter and one on distal trochanter. Each malleolus consists of two parts; tubular stalk and triangular-shaped fan. Though the distinctive sense organ, the morphological structure and function of malleolar sensory system are not yet sufficiently known. Some researchers have made different studies and various assumptions. Bernard (1896) stated that malleoli in solifuges re homologous with scorpion pecten. Rühlemann (1908) showed that the general morphological organization of malleoli on *Galeodes araneoides* and *G. caspius*, and suggested olfactory or tactile function. Cloudsley-Thompson (1961) stated that malleoli show sexual dimorphism (in females are wider than in males) and suggested that malleoli might be functioning as detection of substrate vibrations via observations on *Galeodes arabs*. Brownell and Farley (1974) surveyed ultrastructure of malleoli on *Chanbria* sp. and described the as chemoreceptors. Klann (2009) showed that malleoli are exceptionally innervated sensory organ with ultrastructural analyses on *Eusimonia mirabilis* and *Gluvia dorsalis*.

## MATERIAL AND METHODS

Only male specimens of *Gylippus (Paragylippus) monoceros* Werner were used in this study, collected from type locality (♂ Topotype: 38°35′22,8″N, 35°27′59,4″E, 2100 a.s.l., 21.05.2016, Lifos Mtn., Kayseri Province, Turkey). For Scanning Electron Microscopy (SEM), malleoli were kept overnight in absolute ethanol. After dehydration, specimens were gold-coated in a Quorum SC7620 sputter coater. Morphological structures were studied and photographed at an accelerating voltage of 10kV in a ZEISS Sigma 300 scanning electron microscope at the Science Application and Research Center in Van Yüzüncü Yıl University. Specimens are deposited in the solifuge collection at the Hakkari University Zoological Museum (HAKZM). For light microscopy, malleolus dissecting with trochanter were fixed in formaldehyde. The paraffin blocks were cut into 5µm serial sections. After placing on glass microscope slides, Hematoxylin and Eosin (H&E) stains were used for recognizing various tissue types. The visualization od tissue structures were studied with Leica ICC50 HD attached to Leica DM500 microscope.

## RESULTS

General view of a male *Gylippus (Paragylippus) monoceros* Werner as in Fig.1A. Malleoli (racquet organs) are located on the ventral side of 4th pair of walking legs, two of malleoli on coxa, two on proximal trochanter, one on distal trochanter (on the right corner of Fig.1).



**Figure 1.** Habitus of male *Gylippus (Paragylippus) monoceros* Werner. (The small figure on the right corner shows that the malleoli on the ventral side of 4th pair of legs)

Each malleolus comprises of two parts as malleolar fan and malleolar stalk (Figs. 2A, B). There are small and quite sparse microtrichia like epicuticular protrusions on the anterior side of fan surface (Fig. 2C). The posterior side of malleolar fan has smooth surface and no protrusions (Fig. 2D). The both sides of malleolar fan surface look wavy and have numerous slits (Figs. 2C, D). Malleolar stalk is corrugated and there are numerous protuberances on the entire surface of malleolar stalk (Fig. 2E, F).

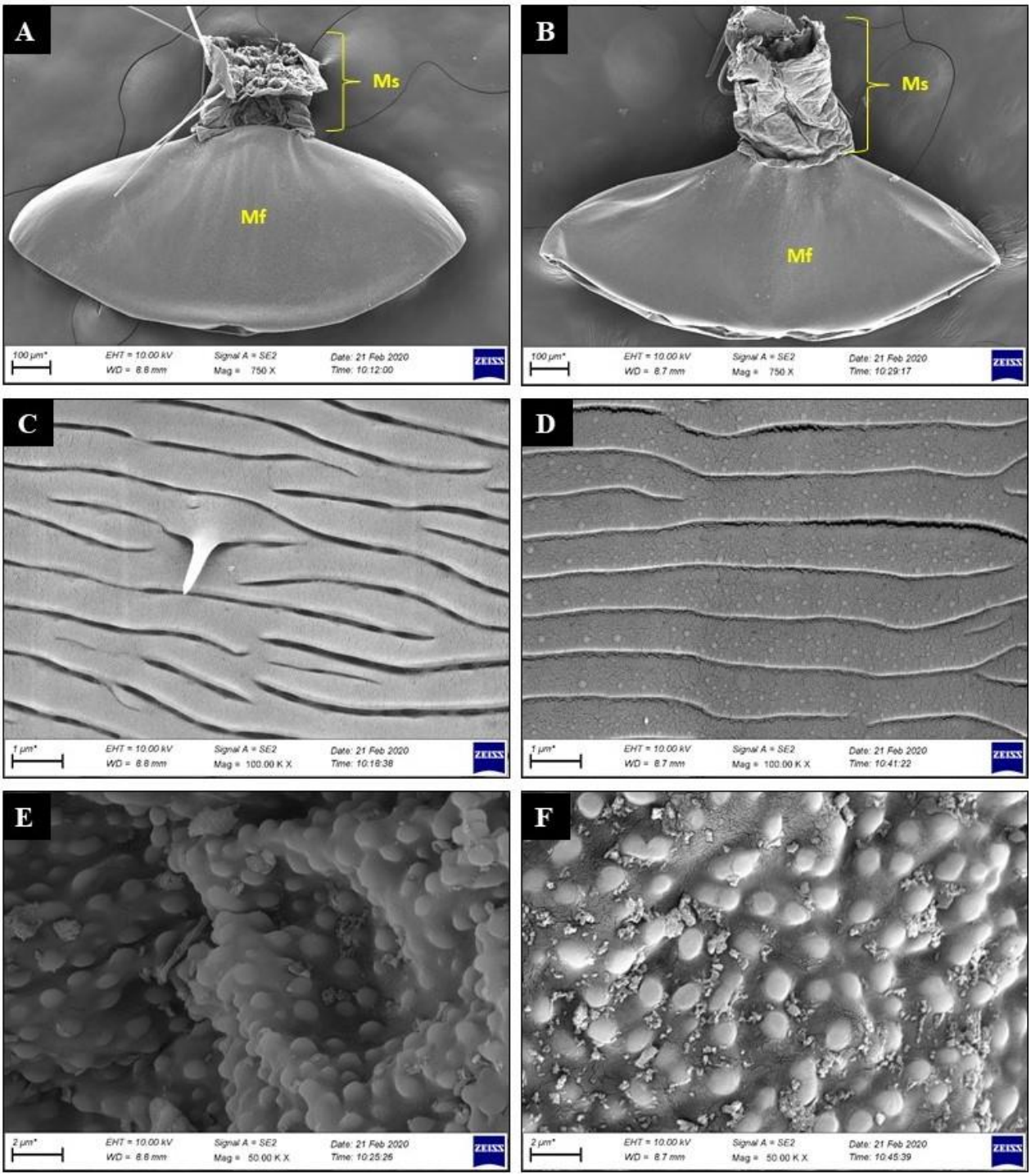



**Figure 2.** The SEM micrographs of coxal malleolus: Anterior side (A, C, E). Posterior side (B, D, F). C, D: Malleolar fan surface. E, F: Granular structures (protuberances) on malleolar stalk. Abbreviations: Mf: Malleolar fan, Ms: Malleolar stalk

Figure 3A shows the frontal side of a malleolus. The posterior ridge is folded inward ventrally (Figs.3B, C). The inwardly folded surface has microtrichia like epicuticular protrusions and pit like cuticular invaginations (Fig. 3C). Posterior ridge composes of two different surfaces as pleats and corrugations Figs, 3D, E). Pleats consist of overlapping cuticular layers. Corrugations surface consists of longitudinally protuberances rows in good order, unlike typical corrugated surface (Figs. 3D-F). There is sensory groove between pleats and

corrugations layer (as seen in Fig.3E). There is also a deep gap between anterior and posterior ridge (Figs. 3D-E).

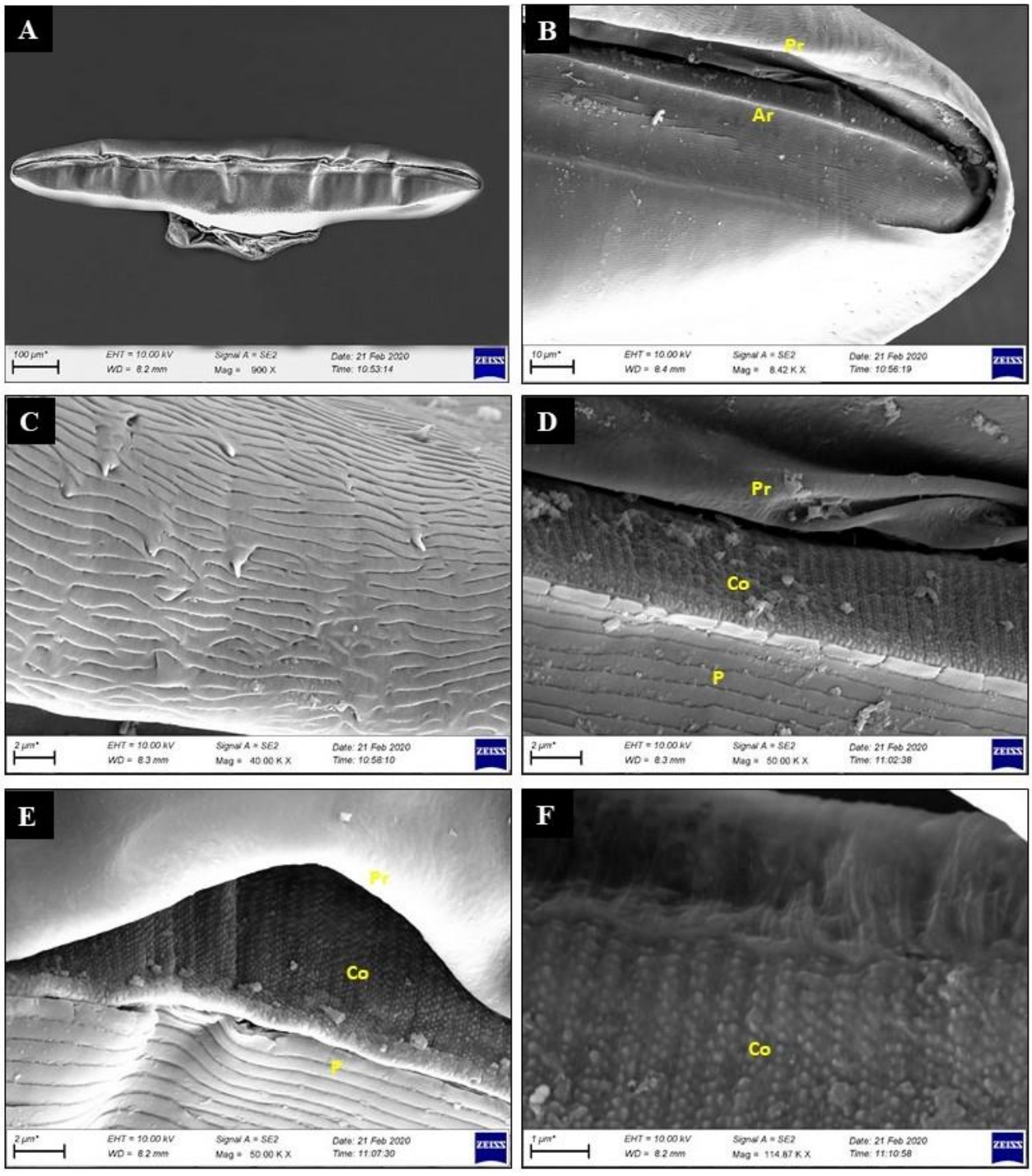



**Figure 3.** The SEM micrographs of the frontal side of coxal malleolus: A: Front side. B. Higher magnification of right edge of frontal view. C. An overview of anterior side surface from the front. D, E, F: Close-up view of frontal side. Abbreviation: Ar: Anterior ridg e, Pr: Posterior ridge, Co: Corrugations, P: Pleats.

Figure 4 shows the sagittal section of the malleolus from connection with trochanteral segment of the 4th leg. Figure 5 shows the detail micrographs of Fig. 4 from proximal to distal. There is overhang on the malleolar stalk tapering on the malleolar fan (showed with black arrow in Fig.2A, Fig.4 and Fig.5B).

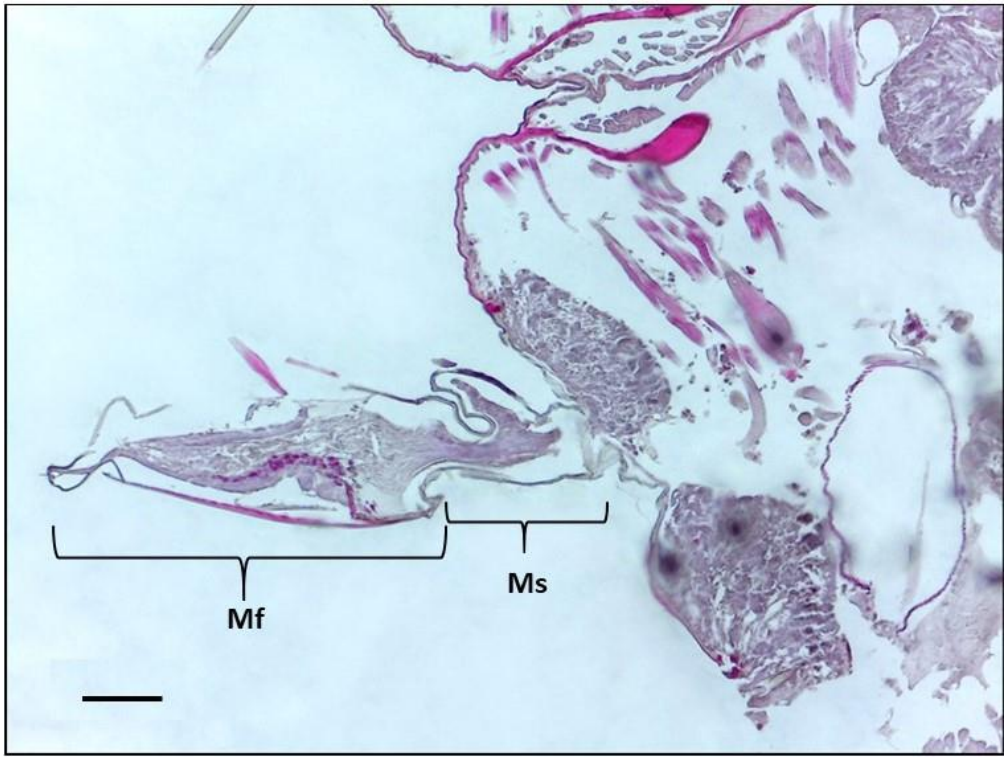



**Figure 4.** The light microscopy of the sagittal view of malleolus of male *G.(P.) monoceros*. Abbreviations: Mf: Malleolar fan, Ms: Malleolar stalk. Scale bar: 100 µm.

Malleolar ganglion places in the base of leg part and consists of numerous cell bodies (Fig. 5A). There are inner dentritic segments projecting from the malleolar stalk into the malleolar fan (Fig.4, Figs. 5A-C). Inner dentricitc segments contains sensory cell and sensory fibers. Sensory cells are spindle shaped and swollen. Numerous nuclei are present through middle of malleolar fan (Fig. 4, Fig. 5C). The cuticle of malleolar stalk proximally is less sclerotized than distal part (Fig. 5A). The epithelia underlay the cuticle of the malleolar stalk and these epitalia separate from cuticle with distinct gap (Fig.5C) The epithelia and inner dentritic segments in malleolar fan project into the anterior ridge (Fig. 5D).

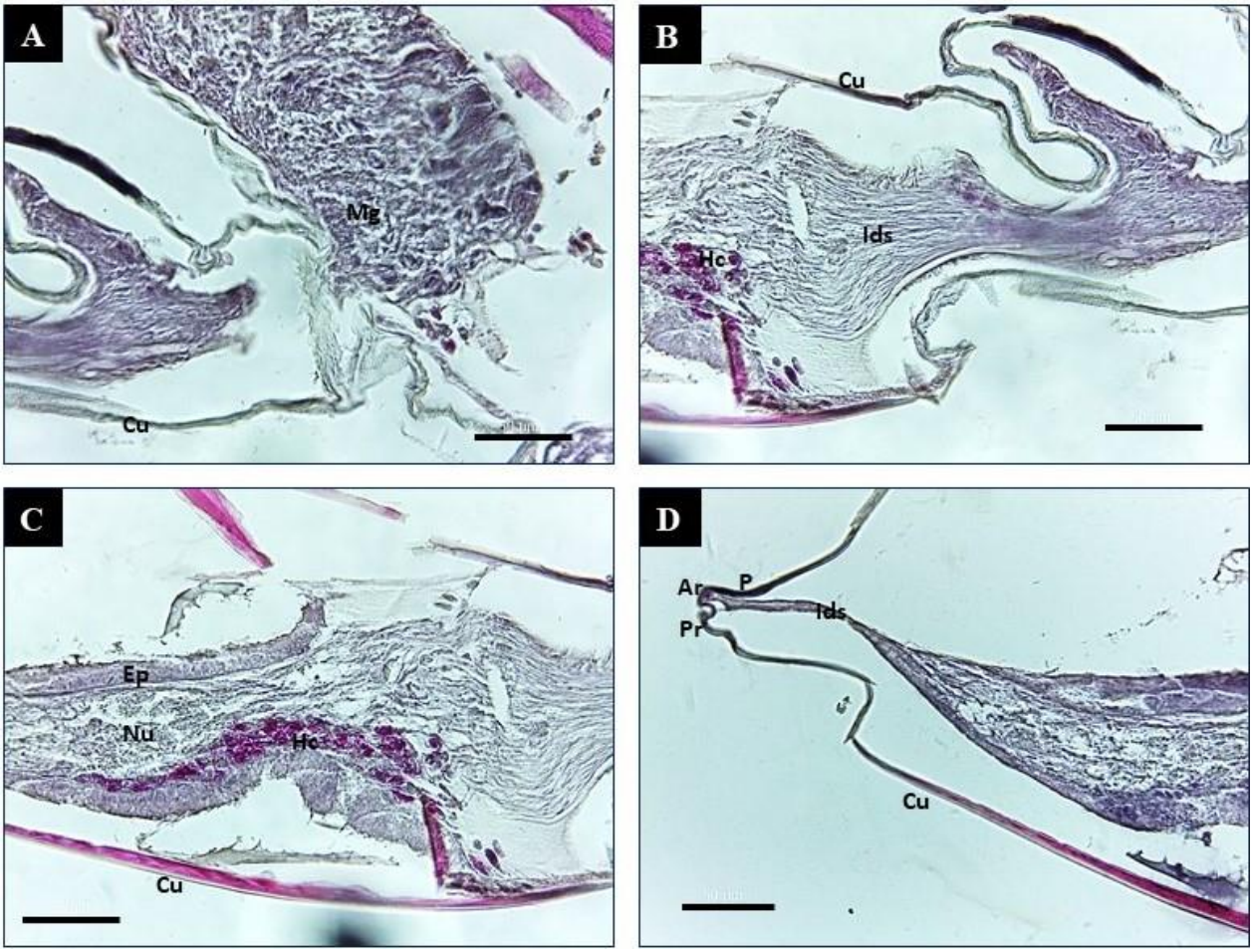



**Figure 6.** The close-up through the malleolus in Fig. 4 from proximal to distal (A-D). Abbreviation: Ar: Anterior ridge, Pr: Posterior ridge, Cu: Cuticle, Ep: Epithelium, Hc: Hemocytes, Ids: Inner dendritic segments, Mg: Malleolar ganglion, Nu: Nucleus, P: Pleats. Sc: Sensory cell. Scale bars: 50 µm

## Discussion

Solifuges possess extraordinary sense organs, malleoli (racquet organs), apart from eyes, slit sense organs, trichobothria, sensory setae, pectines etc. in other arachnids. Some past and present researchers mentioned about the presence of malleoli and their sense organ function before. Ruhlemann (1908) showed the histological organization of the malleoli with transversal and sagittal malleolus section drawings. The sagittal section of the malleolus in this study has similar appearance with Ruhlemann's drawing. Unlike his drawings, epithelial parts are separated from anterior and posterior cuticle parts in the malleolus sagittal section in the present study, and the peculiar pin-like sensory fibres also separated from posterior ridge and stretching through anterior ridge and open to sensory groove. These dissimilarities could be derived from histological section plane and deformation during sectioning. These similarities can't be because of studied different species, because tissue components are same. The existence of sensory cells, sensory fibres in inner dentritic segment proving malleoli function as sensory organ. Brownell and Farley (1973) also described numerous bipolar neurons, microvillar cells releasing a sense secretion in malleolar sensory system. Dendrites terminate in a sensory groove opening outside with a slit, that's why suggested that malleoli function as chemoreceptors. Brownell and Farley (Fig.7; 1973) described a sensory hair on the sagittal section of malleolus on *Chanbria* sp. (Eremobatidae) via light microscope. Yiğit et all. (2012) described numerous epicuticular protrusions on the anterior and posterior sides of malleoli on *Gluviopsilla discolor* (Daesiidae). We claim that this structures, decribe as sensory hair and epicuticular protrusions, are microtrichia. Microtrichia derive from epidermal cells and function as mechanoreceptors (Gorb, 1997). It is also thought that protuberances on the malleolar stalk also serve mechanical functions, though being no electrophysiological data. The malleoli in solifuges could be

homologous with scorpion pectines (Bernard, 1896). Pectine organs are on the ventral side second mesosomal segment used for following odiferous clues with slit openings on the ventral side of peg sensilla of pectines (Wolf, 2007). The malleoli of solifuges must be function as olfactory sense system.

## CONCLUSION

Solifuges have quite special sensory organ as malleoli (racquet organs), unlike other arachnids. Malleolar sensory system must be function as chemoreceptors and mechanoreceptors. Future works should be supported TEM analyses, electrophysiological and neurological studies, besides behavioural, morphological and histological news.

## REFERENCES

Bernard HM 1896. The comparative morphology of the Galeodidae. Transactions of the Linnean Society. 2d Series. Zoology 6: 305-417.

Brownell PH, Farley RD 1974. The organization of the malleolar sensory system in the solpugid, *Chanbria* sp. Tissue & cell 6: 471-485.

Gorb SN 1997. Ultrastructural architecture of the microtrichia of the insect cuticle. Journal of morphology, 234(1): 1-10.

Klann AE 2009. Histology and ultrastructure of solifuges-Comparative studies of organ systems of solifuges (Arachnida, Solifugae) with special focus on functional analyses and phylogenetic interpretations. Pp. 90-95.

Ruhlemann H 1908. Uber die Facherorgane, sog. Malleoli oder Raquettes coxales, des vierten Bein paares der Solpugiden. Zeitschrift fűr wissenschaftliche Zoologie 91: 599-639.

Yiğit N, Erdek M, Koç H, Melekoğlu A 2012. Morphological Comparison of the Malleoli (Racquet Organs) in *Biton zederbaueri* and *Gluviopsilla discolor* (Daesiidae, Solifugae). Entomological News, 122(3), 270-278.

# 3D yazdırma parametrelerinin ABS polimerinin mekanik özelliklerine etkileri ve enjeksiyon baskıları ile kıyaslanması

Beyza FINDIK[1*], Münir TAŞDEMİR[2]

[*1]Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 34722, Türkiye.
[2]Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Müh. Böl., İstanbul, 34722, Türkiye.

beyzafndk@gmail.com

## Özet

Üç boyutlu eklemeli üretim, imalat sanayi için özellikle son yıllarda yeni ve tercih edilir bir üretim yöntemi olmuştur. Bu yöntem prototip hazırlama, bileşen ve sistem elde etme aşamasında uygun parçalar üretmek için kullanılmaktadır. Akademik ve sektörel kaynaklara göre günümüzün üretim yöntemlerinin yerini eklemeli imalat üretim yönteminin alacağı anlaşılmaktadır. Bu yöntemin önemli bir etkiye sahip olacağı alanların başında mühendislik, inşaat ve medikal sektörleri gelmektedir. Eklemeli imalat yönteminde üretilebilirliği etkileyen ana parametre geometridir ve geometrik tasarıma yeni bir yaklaşım gerekmektedir. Geleneksel üretim yöntemlerinden farklı olarak malzemeyi ayrık bir şekilde üst üste ekleyerek üretim, tasarım sırasında boyutlandırma ve tolerans seçimlerini tamamen değiştirmektedir. Kritik geometrik parametreler katman kalınlığı, duvar kalınlığı, nozül çapı, yazdırma açısı ve doluluk oranı gibi yepyeni kavramlarla tanımlanmaktadır. Bu çalışmada 3D yazıcıda farklı doluluk oranı, katman kalınlığı ve yazdırma açısı değiştirilerek ABS polimeri ürünleri yazdırılmıştır. Ayrıca enjeksiyon makinesinde de baskılar alınarak; çekme mukavemeti, elastiklik modülü, % uzama değeri, kopma mukavemeti, sertlik ve Izod darbe mukavemeti değerleri 3D ile üretilen numunelerin değerleriyle karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** 3D yazıcı, eklemeli imalat, ABS polimeri, mekanik özellikler.

# Effects of 3D printing parameters on the mechanical properties of ABS polymer and comparison with injection molding

## Abstract

In recent years, three-dimensional additive manufacturing has become a new and preferred method of production for the manufacturing industry. This method is used to produce suitable parts during prototype preparation, component and system acquisition. According to academic and sectoral sources, it is understood that today's production methods will be replaced by additive manufacturing method. Engineering, construction and medical sectors are the primary areas where this method will have a significant impact. In the additive manufacturing method, the main parameter affecting manufacturability is geometry, and a new approach to geometric design is required. Unlike traditional production methods, by adding the material separately, it changes the selection of sizing and tolerance during production, design. Critical geometric parameters are defined by brand new concepts such as layer thickness, wall thickness, nozzle diameter, printing angle, and fill ratio. In this study, ABS polymer products were printed by changing the different fill rate, layer thickness and printing angle in the 3D printer. In addition, by printing on the injection machine; tensile strength, modulus of elasticity, % elongation value, tensile strength, hardness and Izod impact strength values were compared with the values of samples produced in 3D.

**Keywords:** 3D printer, additive manufacturing, ABS polymer, mechanical properties.

## 1. GİRİŞ

Üç boyutlu baskı teknolojisinin 1980'li yıllarda boy göstermesinin ardından, günümüzde birçok alanda kullanılmaya başlamıştır. Yeni raporların gösterdiğine göre, üç boyutlu yazıcılar ile yapılanlar çocuklar için yapay uzuvlar, bir bebek için soluk borusu implantı, CAT bilgilerinden anatomik organlar, uzayda yiyecek, arabalar ve hatta silah üretimi gibi alanları da kapsamaktadır. Google trendlerine göre üç boyutlu yazıcılar

hakkında yapılan araştırmalarda 2010'dan 2014 yılına kadar büyük bir artış olmuştur. Ayrıca üç boyutlu yazıcılar, üretim sektörü açısından yıkıcı teknoloji olarak sınıflandırılmıştır. Bunun en büyük nedeni ise insanların ihtiyaç duydukları şeyleri bir firmadan satın almak yerine daha düşük maliyetlere evinde ya da iş yerinde üretebiliyor olması olacaktır (Kolitsky 2014). Eklemeli üretim üç boyutlu bir model verisinin genellikle katman katman materyallerin bir araya getirme işlemidir. Ayrıca bu işlem, hızlı üretim ya da hızlı prototipleme olarak da bilinir. Geleneksel üretim tekniklerinin aksine, makinada işleme ya da presleme gibi ürün imalatı sırasında daha büyük bir materyalden asıl ürünü elde etmek için materyallerin bir kısmını uzaklaştırmak yerine eklemeli üretim, ürünün son şeklini malzeme ekleyerek oluşturur. Böylelikle verimli bir ham madde kullanımı sağlanırken istenilen geometrik hassasiyetlere ulaşılmaya çalışılırken de minimum malzeme kaybı meydana gelir (Huang ve ark. 2013). 3D Baskı; bir yazıcı kullanılarak bilgisayar destekli tasarım programları yardımıyla tasarlanmış herhangi bir elektronik datayı kalıp, model vb. araç gereç ihtiyacı duymadan 3D datasının makineye gönderilerek kat kat malzeme ekleyerek 3 boyutlu fiziksel parça imalatı yapmaktır. Prototipleme, imalatı yapılacak ürünün imal edilmeden önce ön şeklinin veya modelinin oluşturulması olarak tanımlanabilir. Oluşturulan şekle o ürünün prototipi denir. Prototipin çok kısa sürede jenerik teknoloji ile üretilmesine hızlı prototipleme denir. Hızlı prototiplemeye ekleyerek büyütme-ekleyerek üretme de denmekte olup bilim dünyasında daha çok 3D baskı ifadesi tercih edilmektedir. Kısaca 3D baskı, kişisel bilgisayarlar ve yazıcılarla ilişkili olup bunlar arasında benzerlik kuran bir teknolojidir. Bir gurup araştırmacı, bu yöntemdeki bilgisayar destekli tasarım vurgusu için elektronik üretim de demektedir (Yılmaz ve ark. 2020) . 1988'de ortaya çıkan yılında bu tekniğin esas ismi "Fused Deposition Modeling (FDM)" 'dir. FDM tekniğinde inşa hammaddesi olan termoplastik malzeme, makaraya sarılmış olarak ince plastik filament halinde cihaza beslenir. Bir dizi kontrollü tahrik düzeneği ile nozüle beslenen filament, nozüle ulaştığında sıcaklıkla eritilerek yarı-ergiyik hale getirilir. İki eksende bilgisayar destekli üretim yazılımı ile hareket edebilen ekstrüzyon kafasındaki ince uçlu bir nozülden erimiş plastik malzeme akıtılıp yüzeye ince bir tabaka halinde sıvanarak katmanlar oluşturulur. Her katmanda tabla bir adım aşağıya iner ve böylece parça katmanlar halinde inşa edilir. Eriyik malzeme yüzeye sıvandığı anda katılaşır ve tüm katmanların inşası tamamlandığında parça tabladan sökülür. İnşa sırasında destek görevi gören bir yapı da gerektiğinde oluşturulur ve imalat tamamlandıktan sonra destek parçadan sökülür. İnşa ve destek malzemesi olarak ABS, PC, PetG ve PLA gibi yüzlerce polimer malzeme kullanılır (Neğiş ve ark. 2014). Plastik enjeksiyonda istenilen boyut hassasiyetinde, mekanik ve fiziksel özelliklerde parça üretimi için enjeksiyon parametrelerinin sağlıklı bir şekilde belirlenip, kontrol edilmesi ve uygulanması gerekmektedir. Enjeksiyon prosesini ve üretilen parça kalitesini etkileyen birçok parametre vardır. Bunların hepsinin birden kontrol edilmesi şüphesiz pek mümkün değildir. Bu parametrelerin başlıcaları; sıcaklık, basınç, zaman ve hızdır (Kamber 2008). Bu çalışmada enjeksiyonla üretilen ABS polimer numunelerinin 3D yazıcı ile üretilen numunelerle mekanik özellikleri karşılaştırılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Kompozisyon ve Malzemeler

Bu çalışmada 3D yazıcıda değişik parametreler kullanılarak on sekiz grup ürün yazdırılmıştır. Bunlara ait bilgi Tablo 1'de verilmiştir. Ayrıca enjeksiyon makinesinde de test numuneleri basılmıştır. Enjeksiyon ve 3D yazıcı için ABS granül ve filamenti OO-KUMA (İstanbul , Türkiye)'dan temin edildi. Yoğunluğu 1,05 g/cm$^3$'tür. Akma mukavemeti 43Mpa'dır. İzod darbe mukavemeti 19kJ\m$^2$'dir. Isıl çarpılma sıcaklığı 100 $^o$C'dir. Rockwell sertlik değeri (R scale) 109 ve su emme oranı %0.2-0.5'tir. Filamentin çapı: 1,75 mm'dir.

**Tablo 1.** 3D üretim parametreleri

| Grup | Kod | Desen | Doluluk Oranı | Katman Kalınlığı | Yazdırma Açısı |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | Z/30/200/45 | Zig-Zag | 30 | 200 | 45 |
| 2. | Z/30/200/90 | Zig-Zag | 30 | 200 | 90 |
| 3. | Z/30/300/45 | Zig-Zag | 30 | 300 | 45 |
| 4. | Z/30/300/90 | Zig-Zag | 30 | 300 | 90 |
| 5. | Z/30/400/45 | Zig-Zag | 30 | 400 | 45 |
| 6. | Z/30/400/90 | Zig-Zag | 30 | 400 | 90 |
| 7. | Z/60/200/45 | Zig-Zag | 60 | 200 | 45 |
| 8. | Z/60/200/90 | Zig-Zag | 60 | 200 | 90 |
| 9. | Z/60/300/45 | Zig-Zag | 60 | 300 | 45 |
| 10. | Z/60/300/90 | Zig-Zag | 60 | 300 | 90 |
| 11. | Z/60/400/45 | Zig-Zag | 60 | 400 | 45 |
| 12. | Z/60/400/90 | Zig-Zag | 60 | 400 | 90 |
| 13. | Z/100/200/45 | Zig-Zag | 100 | 200 | 45 |
| 14. | Z/100/200/90 | Zig-Zag | 100 | 200 | 90 |
| 15. | Z/100/300/45 | Zig-Zag | 100 | 300 | 45 |
| 16. | Z/100/300/90 | Zig-Zag | 100 | 300 | 90 |
| 17. | Z/100/400/45 | Zig-Zag | 100 | 400 | 45 |
| 18. | Z/100/400/90 | Zig-Zag | 100 | 400 | 90 |

## 2.2 Numune Hazırlama

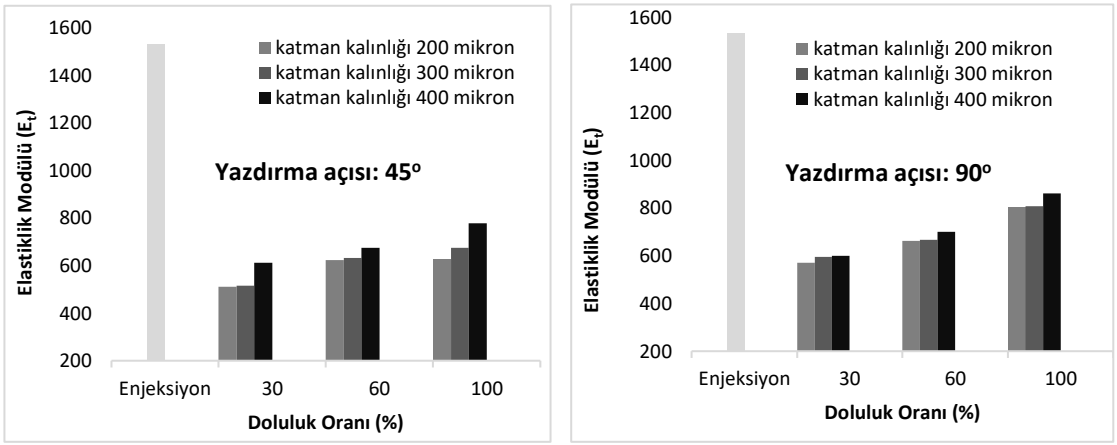
ABS granülü enjeksiyon ile kalıplama yöntemi ile basıldı. Enjeksiyon sıcaklığı 220-250 ºC, enjeksiyon basıncı 120-140 bar ve vida dönme hızı 25 dev/dak. 3D numuneleri ZAXE $X_2$ marka yazıcı ile tabla sıcaklığı: 110 °C, nozül sıcaklığı: 250 °C, baskı hızı %100 ve fan devre dışı bırakılarak basılmıştır. Tablada yapıştırıcı olarak UHU stick magic blue kullanılmıştır.

## 2.3 Test Yöntemi

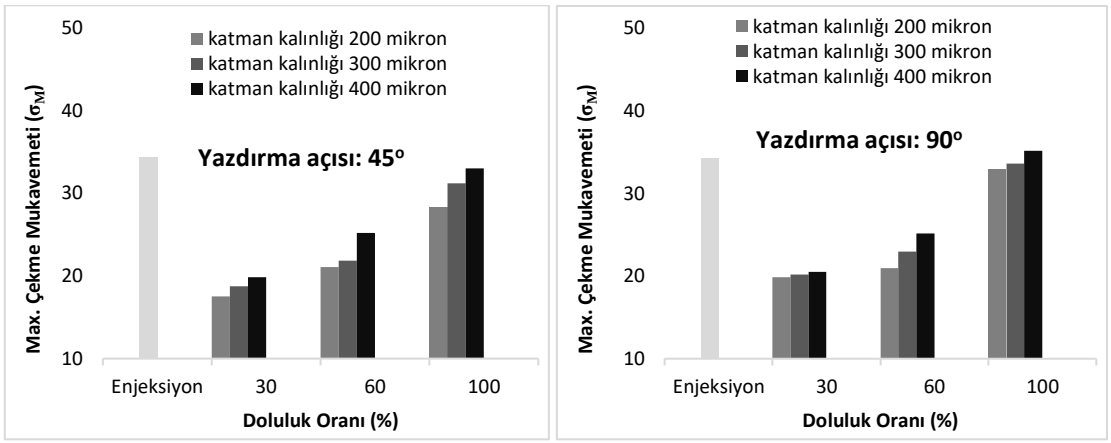
Çekme testleri ASTM D638 standardına göre yapıldı. 10 kN kapasiteli Zwick Z010 (Almanya) marka çekme test cihazında 50 mm/dak.'lık çekme hızı kullanıldı. Dolayısıyla elastik modülü, çekme mukavemeti, kopma mukavemeti ve kopma uzama değerleri bu test cihazı ile elde edildi. Her gruptan dört adet numune kullanıldı ve ortalama değerleri alındı. Sertlik testi, Zwick sertlik ölçüm cihazı ile ASTM D2240 standardına göre yapıldı. Darbe mukavemetini belirlemek için Zwick B5113 darbe test cihazı kullanıldı. ASTM D256 yöntemine göre oda sıcaklığında ve numunelere çentiksiz olarak gerçekleştirildi.

## 3. SONUÇLAR

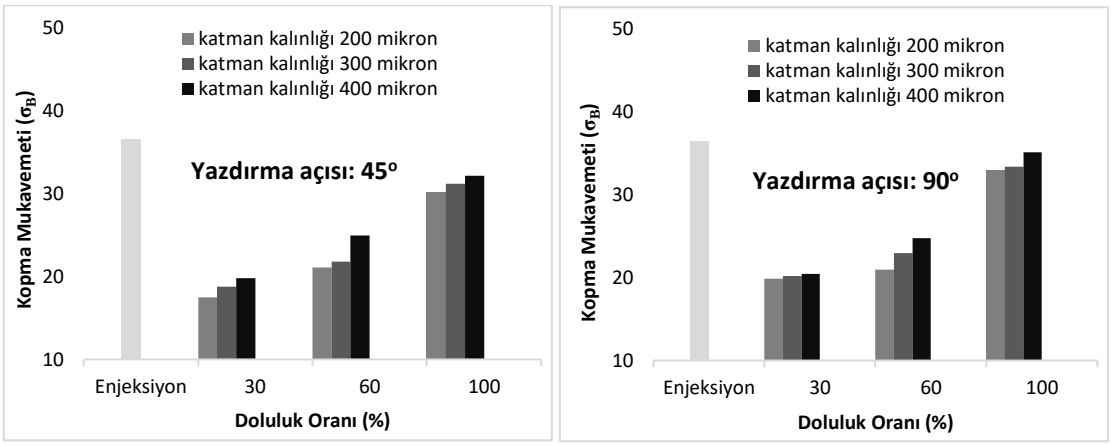
Şekil 1'de ABS polimerinin enjeksiyonda ve üç boyutlu yazıcıda test numunelerinin basılması sonrasında yapılan testlerin sonuçları verilmiştir. Şekil 1A'da 45º ve 90º yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin elastiklik modül değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın elastiklik modül değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların elastiklik modül değerleri enjeksiyonla üretilen parçaların elastiklik modül değerinden düşük çıkmıştır. 90º'lik yazdırma açısıyla üretilen numunelerin elastiklik modül değerleri 45º'lik yazdırma açısıyla üretilen parçalardan daha yüksek değerler vermiştir. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, elastiklik modül değerinin artmasına sebebiyet vermiştir. Şekil 1B'de 45º ve 90º yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin maksimum çekme mukavemeti değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın maksimum çekme mukavemeti değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların maksimum çekme mukavemeti değerleri enjeksiyonla üretilen parçaların maksimum çekme mukavemeti değerinden düşük çıkmıştır. 90º'lik yazdırma açısıyla üretilen numunelerin maksimum çekme mukavemeti değerleri 45º'lik yazdırma açısıyla üretilen parçalardan daha yüksek değerler vermiştir. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, maksimum çekme mukavemeti değerinin artmasına sebebiyet vermiştir.



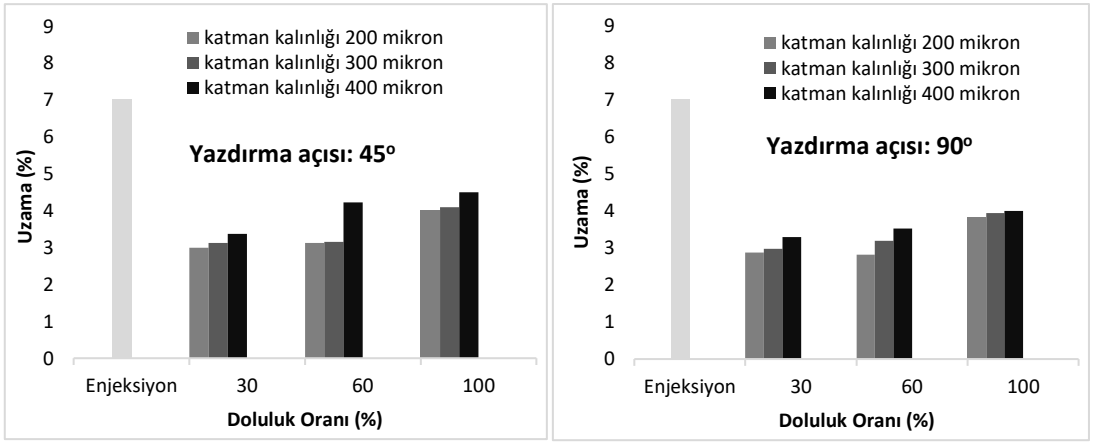

A)



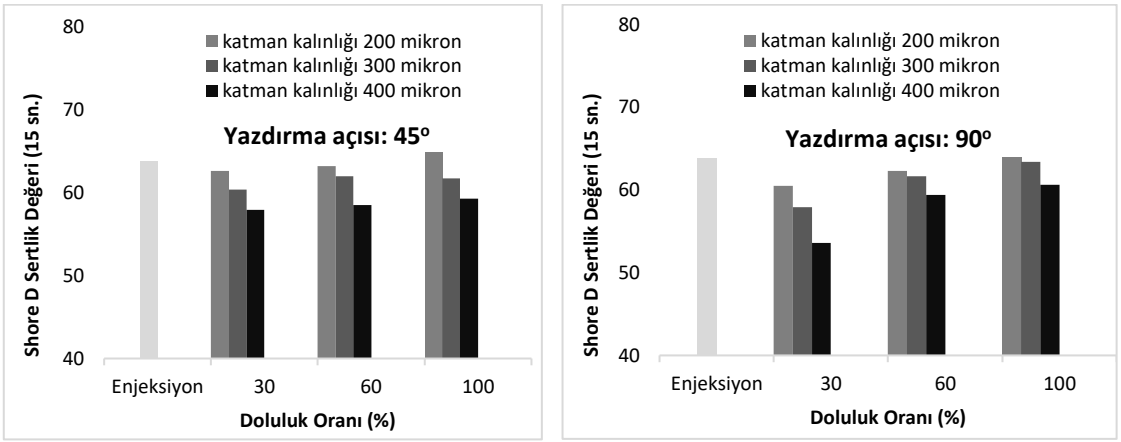

B)


katman kalınlığı 200 mikron
katman kalınlığı 300 mikron
katman kalınlığı 400 mikron
Yazdırma açısı: 45°
Yazdırma açısı: 90°
Kopma Mukavemeti (σB)
Doluluk Oranı (%)
Enjeksiyon
30
60
100
10
20
30
40
50

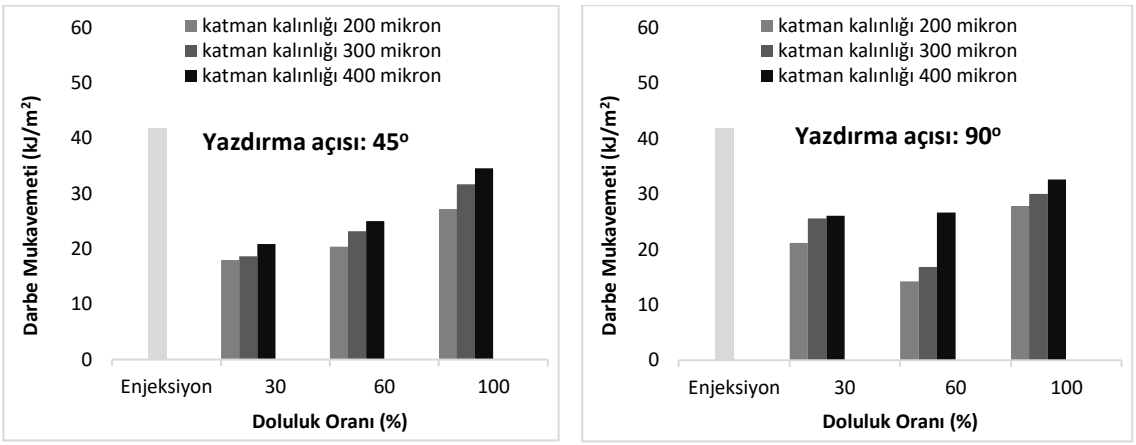
C)


katman kalınlığı 200 mikron
katman kalınlığı 300 mikron
katman kalınlığı 400 mikron
Yazdırma açısı: 45°
Yazdırma açısı: 90°
Uzama (%)
Doluluk Oranı (%)
Enjeksiyon
30
60
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9

D)


katman kalınlığı 200 mikron
katman kalınlığı 300 mikron
katman kalınlığı 400 mikron
Yazdırma açısı: 45°
Yazdırma açısı: 90°
Shore D Sertlik Değeri (15 sn.)
Doluluk Oranı (%)
Enjeksiyon
30
60
100
40
50
60
70
80

E)




F)

**Şekil 1.** ABS polimerinin enjeksiyon ve 3D üretimi sonucu elde edilen mekanik değerleri

O.S Carneiro ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada polipropilen polimerini değişik parametreler kullanarak üç boyutlu yazıcıda test numuneleri yazdırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre enjeksiyonla üretimde elde edilen parçaların mekanik değerleri (elastiklik modülü ve çekme mukavemeti) üç boyutlu yazıcıda elde ettikleri parçaların mekanik değerlerinden fazla çıktığını tespit etmişlerdir. Bu sonuç bizim bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Buna ek olarak Carneiro ve arkadaşları aynı çalışmada yazdırma açısı, katman kalınlığı ve doluluk oranının artmasıyla mekanik değerlerin de artığını belirlemişlerdir. Bu sonuçta bizim sonuçlarımız ile benzerlik göstermiştir (Carneiro 2015).

Şekil 1C'de 45° ve 90° yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin kopma mukavemeti değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın kopma mukavemeti değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların kopma mukavemeti değerleri enjeksiyonla üretilen parçaların kopma mukavemeti değerinden düşük çıkmıştır. 90°'lik yazdırma açısıyla üretilen numunelerin kopma mukavemeti değerleri 45°'lik yazdırma açısıyla üretilen parçalardan daha yüksek değerler vermiştir. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, kopma mukavemeti değerinin artmasına sebebiyet vermiştir.

Şekil 1D'de 45° ve 90° yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin % uzama değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın % uzama değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların % uzama değerleri enjeksiyonla üretilen parçaların % uzama değeri birbirine çok benzer sonuçlar vermiştir. 45°'lik yazdırma açısıyla üretilen numunelerin % uzama değerleri 90°'lik yazdırma açısıyla üretilen parçalardan çok az da olsa yüksek değerler vermiştir. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, % uzama değerinin artmasına sebebiyet vermiştir. Şekil 1E'de 45° ve 90° yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin sertlik değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın sertlik değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların sertlik değerleri enjeksiyonla üretilen parçaların sertlik değerinden düşük çıkmıştır. 45°'lik ve 90°'lik yazdırma açısıyla üretilen numunelerin sertlik değerlerinde önemli bir farklılık tespit edilememiştir. Katman kalınlığının 200 mikrondan 400 mikrona çıkması sertlik değerlerinin düşmesine sebebiyet vermiştir. Fakat doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması sertlik değerini bir miktar artırmıştır. Şekil 1F'de 45° ve 90° yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin Izod darbe mukavemeti değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın Izod darbe mukavemeti değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların Izod darbe mukavemeti değerleri enjeksiyonla üretilen parçaların Izod darbe mukavemeti değerinden düşük çıkmıştır. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, Izod darbe mukavemeti değerinin artmasına sebebiyet vermiştir.

## 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada 3 boyutlu yazıcılarda doluluk oranı, yazdırma açısı ve katman kalınlığının ABS'nin mekanik özelliklerine etkisi, incelenmiş olup elde edilen değerler enjeksiyonla kalıplamada elde edilen değerler ile

karşılaştırılmıştır. Enjeksiyonla kalıplamada elde edilen elastiklik modülü, maksimum çekme mukavemeti, kopma mukavemeti, % uzama, sertlik ve Izod darbe mukavemeti gibi mekanik değerlerin 3 boyutlu yazıcıda elde edilen değerlerden fazla çıktığı tespit edilmiştir. Üç boyutlu yazıcıda doluluk oranının ve katman kalınlığının artmasıyla elastiklik modülü, maksimum çekme mukavemeti, kopma mukavemeti, % uzama ve darbe mukavemeti gibi mekanik değerlerin arttığı görülmüş buna karşılık sertlik değerinin ise katman kalınlığının artmasıyla bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak üç boyutlu yazıcıda numune üretimi enjeksiyona nazaran daha uzun bir işlem süresi gerektirmektedir. Aynı zamanda enjeksiyonda malzeme firesi daha fazla olmaktadır.

## KAYNAKLAR

Carneiro OS, Silva AF, Gomes R, 2015. Fused deposition modeling with polypropylene, materials&design, 83, 768-776.

Huang SH, Liu P, Mokasdar A, Hou L, 2013. Additive Manufacturing and Its Societal Impact:A Literature Review, The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 67 (5) 1-25.

Kamber ÖŞ, 2008. Plastik enjeksiyon kalıplarında basınç ve sıcaklık parametrelerinin ürün kalitesine etkileri ve taguchi yöntemi ile optimizasyonu, Doktora tezi Marmara üniversitesi Fen bilimleri ens.

Kolitsky MA, 2014. Reshaping Teaching and Learning with 3D Printing Technologies. 11301-12.

Neğiş, E, 2014. Turkcadcam, Oto inşaa yöntemleri, 05 ocak 2020 tarihinde http://www.turkcadcam.net/rapor/autofab/ adresinden alındı.

Yılmaz F, Arar ME ve Koç E, 3D Baskı ile Hızlı Prototip ve Son Ürün Üretimi, Metalurji ve malzeme müh. odası dergisi, sayfa:35-40, 05 Ocak 2020 tarihinde https://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi168/d168_3540.pdf adresinden alındı.

# Enjeksiyon makinesi ve üç boyutlu yazıcı ile üretilen ABS polimerinin fiziksel özelliklerini karşılaştırılması

Beyza FINDIK[1*], Münir TAŞDEMİR[2]

[*1]Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 34722, Türkiye.
[2]Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Müh. Böl., İstanbul, 34722, Türkiye.

beyzafndk@gmail.com

## Özet

Üç boyutlu yazıcılar bilgisayar üzerinde modellenmiş veya üç boyutlu olarak taranmış modelleri geleneksel üretim yöntemlerine nazaran oldukça hızlı bir şekilde üretebilen bir cihazdır. Günümüzde dişçilik ve tıp sektöründen tutun da havacılık ve uzay sektörüne kadar çok farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. En çok kullanılan malzemeler ise akrilonitril bütadien stiren (ABS) ve polilaktik asit (PLA)'tir. Küresel rekabetle birlikte ürünlerin pazardaki yaşam sürelerinin kısalması, ürün geliştirme süreçlerinin sıklaşmasını sağlamıştır. Her sektörde olduğu gibi üretim sektöründe artan teknolojik olanaklar ile ürün geliştirme sürecinin kısalmaya devam ettiği gözlenmektedir. En yaygın eklemeli imalat teknolojileri; steryolitografi (SLA), ergiterek yığma ile modelleme (FDM), üç boyutlu yazıcı (3DP), seçmeli lazer sinterleme (SLS), seçmeli lazer ergitme (SLM), elektron ışınlı ergitme (EBM) gibi yöntemlerdir. Bu çalışmada üç boyutlu yazıcıda farklı doluluk oranı, katman kalınlığı ve yazdırma açısı değiştirilerek ABS polimeri ürünleri yazdırılmıştır. Ayrıca enjeksiyon makinesinde de baskılar alınarak; nem emme miktarı, yoğunluk, ısıl çarpılma sıcaklığı, vicat yumuşama sıcaklığı ve aşınma oranı değerleri 3D ile üretilen numune değerleriyle karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** 3D yazıcı, eklemeli imalat, ABS polimeri, fiziksel özellikler.

# Comparison of physical properties of ABS polymer produced by injection machine and three-dimensional printer

## Abstract

Three-dimensional printers are a device that can produce models that are moulded on a computer or scanned three-dimensionally quite quickly compared to traditional production methods. Nowadays, it is widely used in many different fields from dentistry and medicine to aerospace sector. The most used materials are acrylonitrile butadiene styrene (ABS) and polylactic acid (PLA). With the global competition, the shortening of the products' lifetimes in the market has enabled the product development processes to become more frequent. As in every sector, it is observed that the product development process continues to decrease with increasing technological opportunities in the production sector. The most common additive manufacturing technologies are; methods such as stereolithographic (SLA), melting-up modelling (FDM), three-dimensional printer (3DP), selective laser sintering (SLS), selective laser melting (SLM), and electron beam melting (EBM). In this study, ABS polymer products were printed by changing the different filling ratio, layer thickness and printing angle in the three-dimensional printer. In addition, by printing on the injection machine; Moisture absorption amount, density, thermal distortion temperature, vicat softening point temperature and wear rate values were compared with the sample values produced in 3D.

**Keywords:** 3D printer, additive manufacturing, ABS polymer, physical properties.

## 1. GİRİŞ

Günümüzün üretim dünyasında ürünün pazara sürüm süresinin kısaltılması firmaların rekabetçi kalabilmeleri için önemlidir. Bu sürecin kısalmasının yanında, pazara sunumdan sonra gerekecek sorun giderici tasarım gereksinimlerinin de minimize edilmesi hatta sıfırlanması bir diğer önemli, tamamlayıcı koşuldur. Küresel rekabetle birlikte ürünlerin pazardaki yaşam sürelerinin kısalması, ürün geliştirme süreçlerinin sıklaşmasını

sağlamıştır. Her sektörde olduğu gibi üretim sektöründe artan teknolojik olanaklar ile ürün geliştirme sürecinin kısalmaya devam ettiği gözlenmektedir. Günümüz tasarım ve üretim dünyasında müşteri odaklı ürün geliştirme artık kaçınılmaz bir gerçektir (Delikanlı ve ark. 2006). 19. yüzyıldan başlayarak hızla gelişme gösteren endüstri, günümüzde hayatımızın her alanını kapsayan teknik ve teknolojik gelişmelerle ivme kazanmıştır. Teknolojinin üretim ve tüketim aşamasında ihtiyaç duyduğu yüksek bütçe, üç boyutlu yazıcıların önemini arttırmıştır. 3 boyutlu dijital bir tasarımı nesne haline getirebilen 3D yazıcılar piyasada birçok alanda kendini göstermiştir. Mücevher, aksesuar, ayakkabı tasarımında, endüstriyel ve mimari tasarımlarda, otomotiv sanayisinde, hava uzay, dişçilik ve tıp sektöründe, eğitimde, farklı alanlardaki bilimsel çalışmalarda dünya çapında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Evlen ve ark. 2018). Hızlı direkt imalat sistemleri bilgisayar ortamında gerçekleştirilen 3 boyutlu tasarımlardan, direkt olarak hedef parçayı ya da aparatı ürettiklerinden dolayı ürün geliştirme sürecine önemli bir katkı sağlamaktadırlar (Wieneke ve ark. 2003). Plastik türevleri, polimer, metal ve metal alaşımları, seramik vb. gibi geniş bir yelpaze ile bilgisayar teknolojisi eşliğinde üç boyutlu katı obje üretmeyi mümkün kılan yeni jenerasyon imalat teknolojisinin keşfi 1970'li yıllara kadar dayanmaktadır (Matinez ve ark. 2016). Çok boyutlu yazdırma, dijital ortamda hazırlanmış olan üç boyutlu verilerden üç boyutlu katı obje imalatı sürecidir. Bu aşamayı gerçekleştiren makineler çok boyutlu yazıcılar olarak adlandırılır. Bu makineler aracılığı ile üç boyutlu tasarımı gerçekleştirilen veriler, çok kısa bir süre içerisinde elle tutulur şekilde incelenmeye olanak sağlayan katı nesneler haline gelebilmektedir. Yazdırılacak model, amaca hizmet eden çeşitli programlar kullanılarak bilgisayar ortamında dilimleme adı verilen işlemden geçer ve istenen hassasiyetlerde katmanlara ayrılır. Bu katmanlar üç boyutlu yazıcının kullandığı teknolojiye göre farklı işlemden geçen materyal üst üste yığma halinde yazdırılarak somut nesneler haline dönüşür (Çelik 2015). Üç boyutlu yazıcılar yeni bir ürün tasarımı ve geliştirilmesi sürecinde o ürünü elinize alıp kontrol etmenize olanak vermesi en büyük avantajı olarak görülmektedir. Bu yönleriyle üç boyutlu yazıcılar imalat sektöründe geleceği belirleyecek robotlar olarak göze çarpmaktadırlar (Güler 2016). Bu teknolojinin diğer önemli özelliği ise karmaşık yapıya sahip, gerek iç içe sarmal, gerek ince işlemeli modellerde kullanıcıya imalat imkanı sağlamasıdır. Bu teknolojide baskısı alınacak modelin ne kadar karmaşık bir yapıya sahip olduğunun hiçbir sakıncası yoktur (Çifci 2018). 3D yazıcılar endüstri alanında kullanılan geleneksel üretim yöntemlerine kıyasla farklı teknikler kullanarak üretim yapmaktadır. Geleneksel üretim yöntemlerindeki gibi nesneleri keserek, bükerek veya delerek şekillendirmek yerine, dijital olarak tasarlanan modeli katmanlar halinde lazer sinterleme, üst üste yığma, polimer sertleştirme gibi farklı işlem basamakları kullanarak nesneleri şekillendirir. 3D baskı teknolojilerinde en yaygın olarak kullanılan yöntem katmanlı üretim yöntemleri olarak göze çarpmaktadır. Bu yöntemlerden en çok kullanılanı ise plastik malzemenin ergitilerek katı nesneler oluşturulmasını sağlayan FDM yöntemidir (Levy 1996). Enjeksiyon kalıplama metodu, en çok termoplastiklerin şekillendirilmesinde uygulanan bir metottur. Toz veya küçük taneler halindeki termoplastikler, huni yardımıyla, silindir içerisine gönderilir. Isıtıcılar tarafından ısıtılan silindirin sıcaklığı, plastik malzemenin cinsine göre ayarlanır. Silindirin içerisinde ısıtılan plastik madde, hidrolik pistonla veya helezon vidalı mil yardımıyla silindir sonuna doğru taşınır. Yayıcı aracılığıyla hız kazanan erimiş plastik, kalıp boşluğunu doldurur. Kalıp iç boşluğunun şeklini alan plastik, soğutulur. Kalıp açılarak plastik parça çıkarılır. Huni biçimindeki depoya, tanecik halindeki plastik hammaddeler konur. Huninin alt kısmından, vidalı mil üzerine inen plastik tanecikler, helisel vidalı milin dönüş hareketi ile enjeksiyon memesine doğru sürüklenir. Vidalı mil silindirinin dışında, çepeçevre bulunan ısıtıcılar, sürüklenen plastik hammaddeyi istenilen sıcaklığa getirir. Sıcaklık, plastik maddeyi eriterek, bal kıvamında mal durumuna sokar. Bal kıvamındaki plastik madde, enjeksiyon memesinden geçerek kapalı kalıp içerisindeki boşluğa enjekte edilir. Parça kalıpta soğutularak alınır (Kuldaşlı 2005). Gelişen teknoloji ile birlikte imalat yöntemleri her geçen gün farklı bir boyuta ulaşmaktadır. Bunun en önemli örneklerinden biri ise çok boyutlu yazıcılar olarak göze çarpmaktadır. Çok boyutlu yazdırma teknolojisi henüz halk arasında popüler bir yöntem olmamasına karşın, bu teknoloji ile elde edilen başarılar sayesinde her geçen gün daha fazla adı duyulmaktadır. Tasarım ve imalat konusunda sunduğu özgür fikir ve üretim koşullarını baz alındığı zaman, bu sektördeki yeniliklerin de bu kadar hızlı bir şekilde gelişmesi ile doğru orantılı olması hiç de sürpriz değildir (Çifci 2019). Bu çalışmada değişik parametrelerle üretilmiş ABS numunelerinin enjeksiyon ile üretilen numunelere göre fiziksel özellikleri tartışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Kompozisyon ve Malzemeler

Bu çalışmada 3D yazıcıda değişik parametreler kullanılarak on sekiz grup ürün yazdırılmıştır. Bunlara ait bilgi Tablo 1'de verilmiştir. Ayrıca enjeksiyon makinesinde de test numuneleri basılmıştır. Enjeksiyon ve 3D yazıcı için ABS granül ve filamenti OO-KUMA (İstanbul , Türkiye)'dan temin edildi. Yoğunluğu 1,05 g/cm$^3$'tür.

Akma mukavemeti 43Mpa'dır. İzod darbe mukavemeti 19kJ\m$^2$'dir. Isıl çarpılma sıcaklığı 100 $^o$C'dir. Rockwell sertlik değeri (R scale) 109 ve su emme oranı %0.2-0.5'tir. Filamentin çapı: 1,75mm'dir.

**Tablo 1.** 3D üretim parametreleri

| Grup | Kod | Desen | Doluluk Oranı | Katman Kalınlığı | Yazdırma Açısı |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | Z/30/200/45 | Zig-Zag | 30 | 200 | 45 |
| 2. | Z/30/200/90 | Zig-Zag | 30 | 200 | 90 |
| 3. | Z/30/300/45 | Zig-Zag | 30 | 300 | 45 |
| 4. | Z/30/300/90 | Zig-Zag | 30 | 300 | 90 |
| 5. | Z/30/400/45 | Zig-Zag | 30 | 400 | 45 |
| 6. | Z/30/400/90 | Zig-Zag | 30 | 400 | 90 |
| 7. | Z/60/200/45 | Zig-Zag | 60 | 200 | 45 |
| 8. | Z/60/200/90 | Zig-Zag | 60 | 200 | 90 |
| 9. | Z/60/300/45 | Zig-Zag | 60 | 300 | 45 |
| 10. | Z/60/300/90 | Zig-Zag | 60 | 300 | 90 |
| 11. | Z/60/400/45 | Zig-Zag | 60 | 400 | 45 |
| 12. | Z/60/400/90 | Zig-Zag | 60 | 400 | 90 |
| 13. | Z/100/200/45 | Zig-Zag | 100 | 200 | 45 |
| 14. | Z/100/200/90 | Zig-Zag | 100 | 200 | 90 |
| 15. | Z/100/300/45 | Zig-Zag | 100 | 300 | 45 |
| 16. | Z/100/300/90 | Zig-Zag | 100 | 300 | 90 |
| 17. | Z/100/400/45 | Zig-Zag | 100 | 400 | 45 |
| 18. | Z/100/400/90 | Zig-Zag | 100 | 400 | 90 |

### 2.2 Numune Hazırlama

ABS granülü enjeksiyon ile kalıplama yöntemi ile basıldı. Enjeksiyon sıcaklığı 220-250 $^o$C, enjeksiyon basıncı 120-140 bar ve vida dönme hızı 25 dev/dak. 3D numuneleri ZAXE $X_2$ marka yazıcı ile tabla sıcaklığı: 110 °C, nozül sıcaklığı: 250 °C, baskı hızı %100 ve fan devre dışı bırakılarak basılmıştır. Tablaya yapıştırıcı olarak UHU stick magic blue kullanılmıştır.

### 2.3 Test Yöntemi

Isıl çarpılma sıcaklığı ve Vicat yumuşama sıcaklıkları sırasıyla ISO 75 ve ISO 307 test standardına göre CEAST 6521 marka (CeastSpA, Italy) HDT-Vicat test cihazı ile yapıldı. Burada da her gruptan ikişer adet numune test edilmiş ve ortalama değerleri verilmiştir. Nem emme davranışlarının belirlenmesi için ASTM D 6980 test standardı kullanılmıştır. Bu test Kern DBS 60-3 test cihazı ile yapılmıştır. Yoğunluk testi ISO 2781 test standardına göre yapıldı. Aşınma testleri DIN 53 516 test standardına göre Devotrans DA5 (Devotrans test

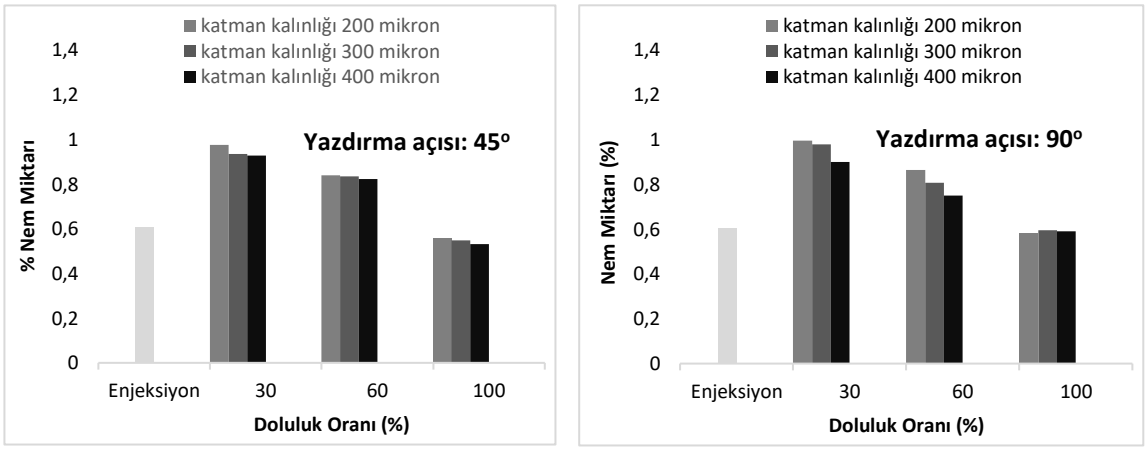
cihazları- Türkiye) aşınma cihazında yapıldı. Her grup için üç numune kullanıldı ve ortalama değerleri verildi. Burada kullanılan numune kalınlığı 7 mm ve numune çapı ise 15,5mm'dir. Aşındırıcıdaki tamburun dönme hızı 40 dev/dak.'dır. Numuneye 10N'luk yük (F) uygulanmıştır. Aşındırma mesafeleri (L) ise 80 m'dir. Numunelerdeki kütle kaybı (Δm) aşınma işleminden sonra ölçülmüş ve spesifik aşınma oranları (Ws) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Ws=(\Delta m) / \rho.F_N.L \ (mm^3/Nm)$$

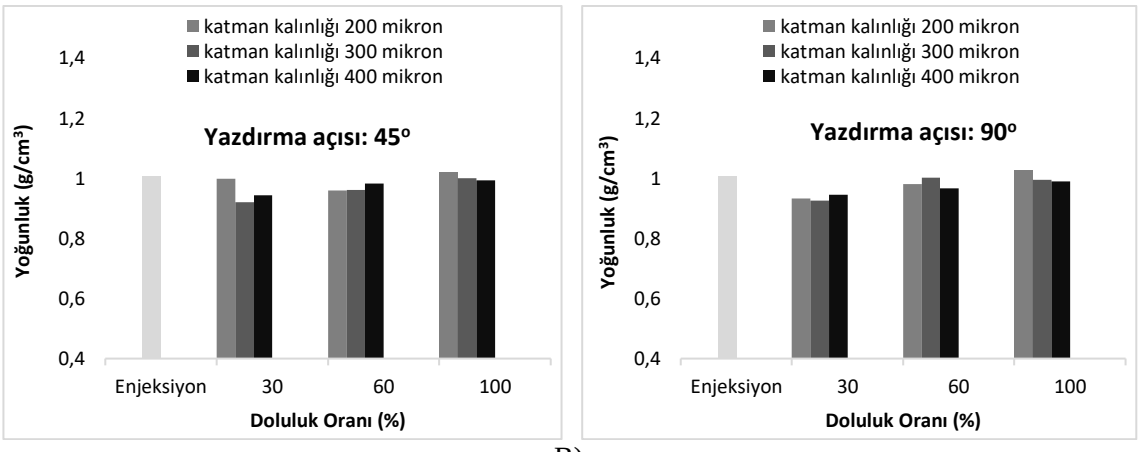
Burada (ρ) numunenin yoğunluğu, ($F_N$) uygulanan yük ve (L) ise kayma mesafesidir.

## 3. SONUÇLAR

Şekil 1'de ABS polimerinin enjeksiyonda ve üç boyutlu yazıcıda test numunelerinin basılması sonrasında yapılan testlerin sonuçları verilmiştir. Şekil 1A'da 45° ve 90° yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin yüzde nem miktarı değerleri ve enjeksiyonla üretilmiş numunelerin yüzde nem miktarı değerleri görülmektedir. Grafiği incelediğimizde 3D ile üretilen numunelerin yüzde nem miktarı değerleri, enjeksiyonda üretilen numune değerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, yüzde nem miktarı değerinin azalmasına sebebiyet vermiştir. Şekil 1B'de 45° ve 90° yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış numunelerin ve enjeksiyonla basılmış numunelerin yoğunluk değerleri verilmiştir. Grafik incelendiğinde yoğunluk değerlerinde önemli bir farklılığın olmadığı görülmektedir.

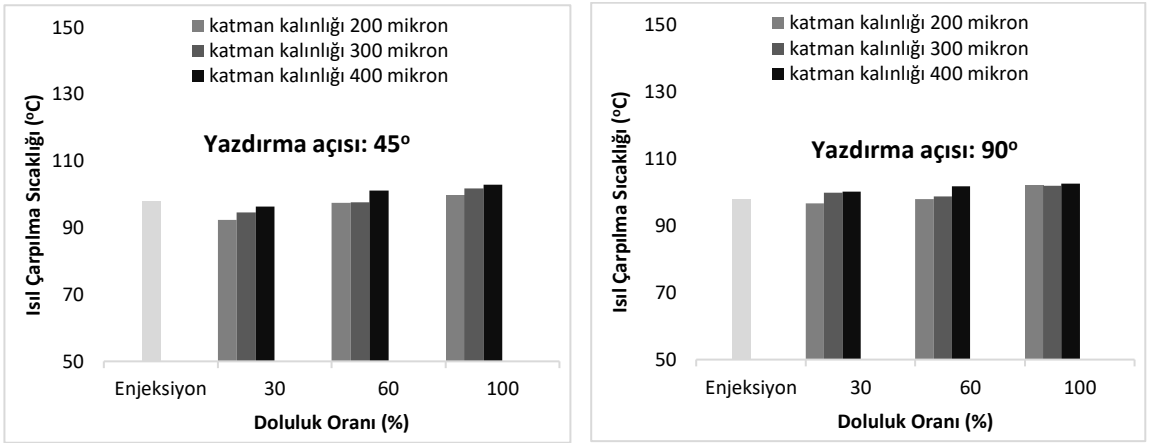



A)

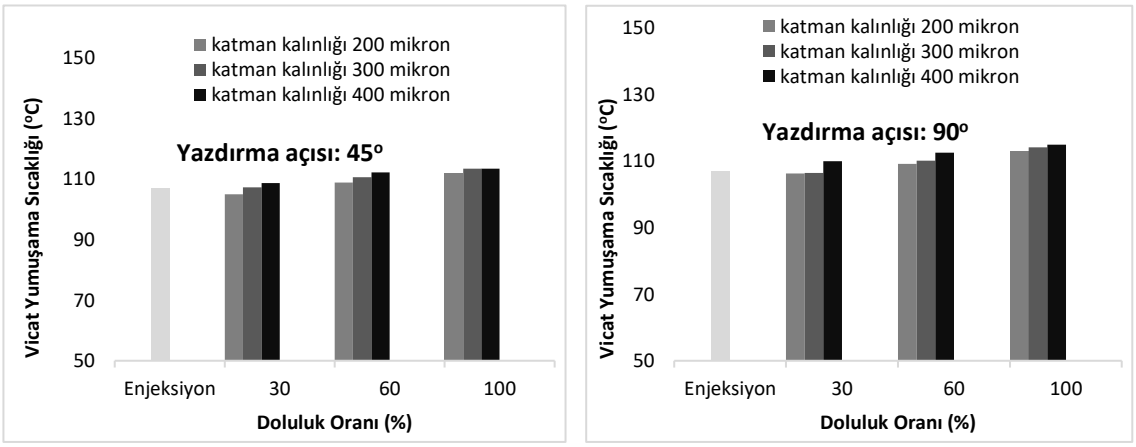



B)

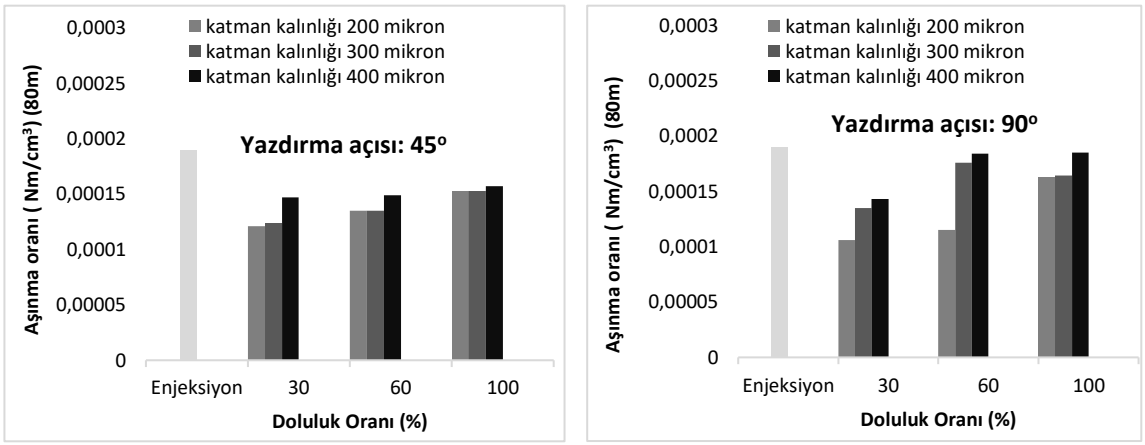
**Şekil 1.** ABS polimerinin enjeksiyon ve 3D üretimi sonucu elde edilen fiziksel değerleri




C)




D)




E)

**Şekil 1.** (Devamı)

Şekil 1C'de 45º ve 90º yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin ısıl çarpılma sıcaklık değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın ısıl çarpılma sıcaklık değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların ısıl çarpılma sıcaklık değeri enjeksiyonla üretilen parçaların ısıl çarpılma sıcaklık değeri ile yakın çıkmıştır. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, ısıl çarpılma sıcaklık değerinin artmasına sebebiyet vermiştir. Şekil 1D'de 45º ve 90º yazdırma

açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin vicat yumuşama sıcaklık değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın vicat yumuşama sıcaklık değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların ısıl çarpılma sıcaklık değeri enjeksiyonla üretilen parçaların vicat yumuşama sıcaklık değeri ile yakın çıkmıştır. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, vicat yumuşama sıcaklık değerinin artmasına sebebiyet vermiştir. Şekil 1E'de 45$^{o}$ ve 90$^{o}$ yazdırma açılarında, 200-300 ve 400 mikron katman kalınlıklarında ve 30-60-100 doluluk oranlarında yazdırılmış ABS polimerinin aşınma oranı değeri ve enjeksiyonla üretilmiş olan parçanın aşınma oranı değerleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi üç boyutlu yazıcıda üretilen parçaların aşınma oranı değerleri enjeksiyonla üretilen parçaların aşınma oranı değerinden düşük çıkmıştır. Doluluk oranının 30'dan 100'e çıkması ve katman kalınlığının ise 200 mikrondan 400 mikrona çıkması, aşınma oranı değerinin artmasına sebebiyet vermiştir.

## 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada 3 boyutlu yazıcılarda doluluk oranı, yazdırma açısı ve katman kalınlığının ABS'nin fiziksel özelliklerine etkisi, incelenmiş olup elde edilen değerler enjeksiyonla kalıplamada elde edilen değerler ile karşılaştırılmıştır. Enjeksiyonla kalıplamada elde edilen nem emme miktarı ve aşınma oranları gibi fiziksel değerlerin 3 boyutlu yazıcıda elde edilen değerlerden az çıktığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, enjeksiyonla kalıplamada elde edilen yoğunluk, ısıl çarpılma sıcaklığı ve Vicat yumuşama sıcaklığı gibi fiziksel değerlerin 3 boyutlu yazıcıda elde edilen değerler ile yakın çıktığı tespit edilmiştir. Üç boyutlu yazıcıda doluluk oranının ve katman kalınlığının artmasıyla nem emme miktarı hariç diğer fiziksel değerlerin arttığı görülmüştür. Bunlara ek olarak üç boyutlu yazıcıda numune üretimi enjeksiyona nazaran daha uzun bir işlem süresi gerektirdiği ve aynı zamanda enjeksiyonda malzeme firesi daha fazla olduğu tespit edildi.

## KAYNAKLAR

Çelik D, 2015. "Üç boyutlu yazıcı tasarımı, prototipi ve tersine mühendislik uygulamaları," Yüksek lisans tezi, Endüstriyel Tasarım ve Mühendisliği Bölümü, Karabük Üniversitesi, Karabük, Türkiye.

Çifci, U, 2018. "Üç boyutlu tasarım ve imalat teknolojilerinin imalat için tasarıma olan etkilerinin incelenmesi," Yüksek lisans tezi, Kompozit Malzeme Teknolojileri Bölümü, Düzce Üniversitesi, Düzce, Türkiye.

Çifci U. https://www.mikrofabrika.com/3d-yazici-nedir/ (erişim tarihi:15 Mart 2019)

Delikanlı K, Sofu MM, Bekçi U. 2006. Üretim sektöründe hızlı direkt imalat sistemlerinin yeri ve önemi. Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi;(4):33-39.

Evlen H, Erel G, Yılmaz E. 2018. 3 Boyutlu yazıcı tasarımı ve yazdırma doluluk oranının mekanik özellikler üzerine etkisinin incelenmesi. International Journal of 3D Printing Technologies and Digital Industry dergisi 2:1, 23-31.

Güler B, 2016. "Çift başlı kartezyen tipi 3 boyutlu yazıcı tasarım ve prototip imalatı (granülden modele)," Yüksek lisans tezi, Endüstriyel Tasarım ve Mühendisliği Bölümü, Karabük Üniversitesi, Karabük, Türkiye.

Kuldaşlı AB, 2005. Plastik enjeksiyon yöntemi ile parça imalatı, imalat hataları ve hata tespiti, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Levy, JGN, Schindel R, 1996. "Rapid manufacturing and rapid tooling with layer manufacturing (lm) technologies," State of The Art Future Perspektives, vol. 1, no. 1, pp. 1–21.

Martinez EHV, Can E. 2016. "Bilgisayar destekli seramik üretim yöntemi olarak üç boyutlu yazıcılar ve günümüz koşullarında uygulama örneği," Sanat Tasarım Dergisi, c. 6, s. 1, ss. 1– 14.

Wieneke BMT, Gerber HW 2003. Rapid Prototyping Technology New Potentials For Off Shore And Abyssal Engeneering. The Thirteenth International Offshore and Polar Engineering Conference; 314.

# Antihistaminiklerin kardiyotoksik etkileri

Rahmi Canbar[1*]

*[1]Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD, Konya, Türkiye

*rahmicanbar@hotmail.com

**Özet**
Canlıda birçok dokuda (mast hücreleri, bazofiller, damarlar, mide enterokromafin benzeri hücreler, beyin, vs) bulunan ve salgılanan histamin, alerjik reaksiyonlar ve yangısal reaksiyonlarda rol alır. Histaminin bu etkilerini engelleyebilmek için klasik antihistaminikler olarak da tanımlanan histamin 1 reseptör (H1R) antagonistleri hem veteriner hekimlikte hem de beşeri hekimlikte sıklıkla reçete edilmektedir. Klasik antihistaminikler klinikte kullanıldıkça zaman içinde istenmeyen etkileri gözlenmeye başlanmıştır. Bu yan etkiler arasında ise kardiyak istenmeyen etkiler hayatı tehdit edecek düzeylerde rapor edilmektedir. Bu bildiride histamin, antihistaminikler, antihistaminiklerin sınıflandırılması, kalbin çalışma prensibi ve H1R antagonistlerinin kalp üzerine etkileri güncel literatürler kullanılarak hazırlanmıştır.
**Anahtar kelimeler:** Antihistaminikler, kardiyak yan etkiler

## Cardiotoxic effects of antihistamines

**Abstract**
Histamine, which is found and secreted in many tissues (mast cells, basophils, vessels, stomach enterochromaffin-like cells, brain, etc.) in living organisms, is involved in allergic reactions and inflammatory reactions. In order to prevent these effects of histamine, histamine 1 receptor (H1R) antagonists, also known as classical antihistamines, are frequently prescribed in both veterinary and human medicine. As classical antihistamines are used in the clinic, unwanted effects have started to be observed over time. Among these side effects, cardiac adverse effects are reported at life-threatening levels. In this paper histamine, antihistamines, classification of antihistamines, working principle of the heart and the effects of H1R antagonists on the heart have been prepared using current literature.
**Keywords:** Antihistamines, cardiac side effects

## 1.Giriş

Histamin alerjik hastalıklar ve yangısal olayların patafizyolojisinde salınan en önemli mediatördür. Histamin (2-[4-imidazol]etilenamin) Dale ve Laidlaw tarafından 1910 yılında keşif edilmiştir. Histidin amino asidinden, histidin dekarboksilaz aracılığı ile sentezlenir (Dale ve Laidlaw 1910).Histaminin insanlarda bilinen 3 kaynağı vardır.

- Mast hücreleri ve bazofiller,
- Midedeki enterokromafin benzeri hücreler ve
- Beyindeki histaminerjik sinir uçlarıdır (MacGlashan 2003).

Ratlarda yapılan çalışmada histamin tüm dokularda bulunurken, mide, lenf düğümü ile timusda yüksek düzeylerde kalp, dalak ile böbrekte orta düzeylerde ve beyin, karaciğer, akciğer ile bağırsakta ise düşük düzeylerde gözlenmiştir (Zimmermann ve ark 2011).

## 2.Antihistaminikler

Antihistaminikler Bovet ve Staub tarafından 1937 yılında keşfedilmiştir (Soldovieri ve ark 2008) ve 1941 yılında kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. 1943 yılında ise merkezi sinir sistemi (MSS) ile ilgili yan etkileri rapor edilmiş ve 1955 yılında ise alerjik reaksiyonları bastırdığı ortaya konmuştur (Simons ve Simons 2011)

## 2.1.Antihistaminiklerin Sınıflandırılması

Antihistaminikler kliniğe çıkışına göre 3 nesile ayrılmaktadır, ancak bilim dünyasında bu sınıflandırma hala tartışmalıdır. Tripelenamin, difenhidramin, hidroksizin, klorfeniramin, bromfeniramin ve siproheptadin birinci nesil antihistaminiklerdir. Sedadif ve antikolinerjik özellikleri kullanımını kısıtlamaktadır. Bu yan etkilerden kurtulmak için terfenadin, astemizol, loratadin ve setirizin gibi ikinci nesil antihistaminikler geliştirilmiştir. İkinci nesil antihistaminikler daha güvenli olmasına rağmen 1986 yılında terfenadin ve astemizolle doz aşımı yapanlarda ventrikuler aritminin klasik formu olan torsade de pointes (TdP) rapor edilmiştir (Woosley 1996). Üçüncü nesil antihistaminikler genel olarak birinci ve ikinci nesil antihistaminiklerin aktif metebolitleri olarak tanımlanmaktadır. Üçüncü nesil antihistaminikler genel olarak ilaç-ilaç etkileşimi, MSS ve kardiyatoksik etkileri minimize olan ilaç grubu olarak ifade edilmektedir. Üçüncü nesil antihistaminikler CYP 450 enzimlerinin aktivitelerini değiştirmezler. Klasik örnek olarak feksofenadin, norastemizole ve dekarboetoksiloratadin verilebilir (Handley ve ark 1998, Holgate ve ark 2003)

P-glikoprotein (P-gp) maddesi beyin kapillalarında efflux pompasıyla ilişkili atılım mekanizmasında görev almaktadır ve MDR1 geni ile kodlanır. MDR1/KO farelerde birinci (difenhidramin, hidroksizin ve triprolidin) ve ikinci nesil antihistaminiklerle (setirizin, loratadin ve desloratadin) yapılan çalışmada birinci nesil antihistaminiklerin plazma konsantrasyon-zaman eğrisi ile beyin konsantrasyon-zaman eğrisinin benzer olduğu gözlenirken, ikinci nesil antihistaminiklerde beyin konsantrasyon-zaman eğrisinin normal tip farelere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuçta birinci nesil antihistaminiklerin yüksek oranda beyin dokusuna penetre olduğu, ikinci nesil antihistaminiklerin ise beyin dokusuna penetre olamadığı ifade edilmiştir (Chen ve ark 2003).

H2 reseptörü (H2R)'nün genellikle midede bulunduğu ve mide asidinin salgılanmasında etkili olduğu bilinmektedir. Mide ülserlerinin tedavisinde H2R antagonistleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca histaminin pozitif intotropik etkisinin ortadan kaldırılması ve kardiyak outputun azaltmasından dolayı konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda kardiyoprotektif olarak kullanılabilir (Kim ve ark 2006). H2R/KO farelerde yapılan çalışmada kalp yetmezliğine karşı bir direnç olduğu ve aortik daralmalarda daha düşük seviyelerde kardiyak fibrozis şekillendiği gözlenmiştir. Histamin salınımının durdurulması veya reseptörlerin blokajı histaminin biyolojik etkilerini ortadan kaldırır. Doksorubisin kaynaklı kardiyomiyopatili tavşanlarda ve atriyal taşikardi olan köpeklerde H2R blokörleri kalp krizlerine karşı tedbir olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Takahama ve ark 2010, Monczor ve Fernandez 2016) Antihistaminikler, reseptörlere spesifik olarak bağlanır ve histamin veya diğer agonistlerin yaptığı etkileri sonlandırırlar (Tablo 1) (Hill ve ark 1997).

Tablo 1. Histamin reseptörleri.

| **Reseptör** | **Lokalizasyon** | **Biyolojik etki** | **Agonist** | **Antagonist** |
|---|---|---|---|---|
| H1R | Düz kas endotel hücreleri, adrenal medulla, kalp, MSS | Düz kasların kasılması, NO oluşumunun uyarılması, endotel hücrelerinin kasılması, vasküler geçirgenliğin artması, hormon salınımının uyarılması, negatif inotropizm, K kanal bloğuyla depolarizasyon, inositol fosfolipit hidrolizi, Ca mobilizasyonu, Ca bağlı potasyum akımı ile hiperpolarizasyon | Histamin 2-[3-(Triflorometil) fenil] histamin 2-piridiletilamin 2-metilhistamin | Mepiramin Klorfeniramin Triprolidin Temelastin Difenhidramin Prometazin |
| H2R | Mide paryetal hücreleri, damar düz kasları, süpresör T hücreleri, nötrofiller, MSS, kalp, uterus (sıçan) | Gastrik asit sekresyonunun uyarılması, düz kaslarda gevşeme, adenil siklazın uyarılması,kardiyak kaslar üzerine pozitif kronotropik ve inotropik etki, hiperpolarizasyon veya MSS'de sinyal iletiminin kolaylaştırılması, kalsiyum bağımlı potasyum kanal bloğuyla hiperpolarizasyon, lenfosit fonksiyonunun inhibisyonu | Histamin Amthamin Dimaprit Impromidin Arpromidin | Simetidin Ranitidin Tiotidin Zolantidin Famotidin |

Uyku hali, dikkat dağınıklığı, REM uykusu, sayıklama, ağız kuruluğu, intramuskuler enjeksiyonlarda gelişen doku harabiyeti, fetüste anomali gibi etkileri birinci, ikinci ve üçüncü nesil antihistaminiklerde farklı derecelerde ortaya çıkmaktadır (Randall ve Hawkins 2018). Antihistaminikler kimyasal yapılarına göre 7 gruba ayrılır (Tablo 2). Birinci nesil H1 antihistaminiklerin büyük ölçüde ve ikinci nesil antihistaminiklerden

loratadin, desloratadin, ebastin ve mizolastin daha az ölçüde sitokrom P450 enzim yolu ile metabolize edilir. Aynı yolağı kullanan veya bu enzimi indükleyen diğer ilaçlarla kullanımı etkinliğini değiştirebilir (Greaves 2005).

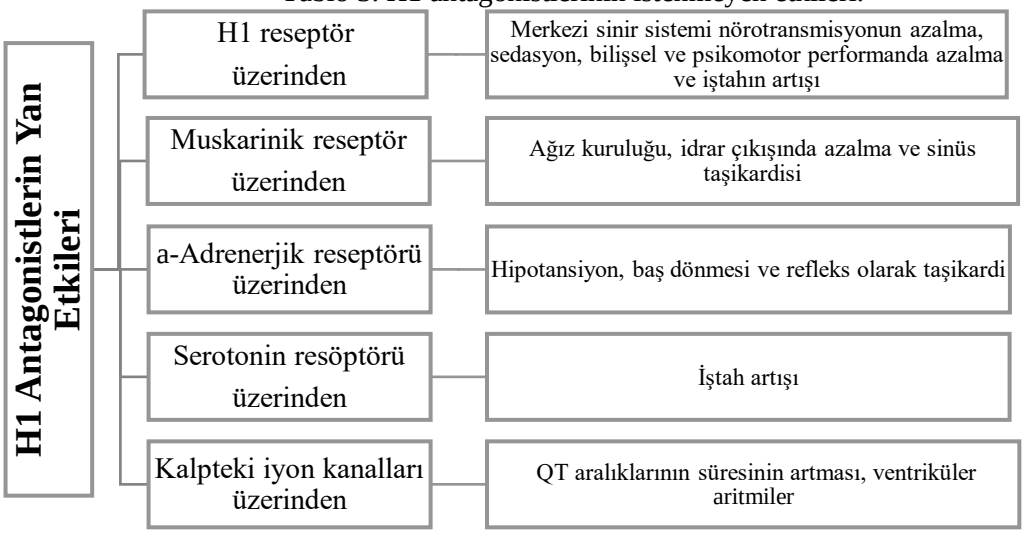
Tablo 2. Kimyasal yapılarına göre antihistaminikler.

| Sınıflar | Birinci nesil | İkinci nesil |
|---|---|---|
| 1-Alkilamin | Klorfeniramin, triproliden | Akrivastin |
| 2-Piperazinler | Hidroksyazin | Setirizin, L-setirizin |
| 3-Piperidinler | Siproheptadin, ketotifen | Astemizol, loratidin, desloratadin, terfenadin |
| 4-Etanolaminler | Difenhidramin, klemastin | |
| 5-Etilendiaminler | Tripelenamin | |
| 6-Trisiklikler | Doksepin | |
| 7-Fenotiazinler | Prometazin, trimeprazin | |

## 2.1.1.H1R Antagonistleri

H1R antagonistleri klinik olarak genellikle alerjik rinitis, alerjik konjonktivitis, ürtiker gibi histamin salınımına bağlı alerjik reaksiyonlar ve alerjik olmayan MSS hastalıklarında kullanılır (Simons ve Simons 2011). Klasik H1R antagonistlerinin bazıları bromofeniramin, karbinoksamin, antazolin, prometazin, buklizin, azatadin, klorfeniramin, doksilamin, hidroksizin, triprolidin, krimastin, siklizin, mekuitazin, siklizin, siproheptadin, dimenhidrinatketotifen, pirimidin, tripelenamin, trimepazin, feniramin, difenhidramin, oksatomit, dimetilamin, fenilotoksamin gibi antihistaminikleri içerir (Yayla ve ark 2013). İkinci nesil H1R antagonistleri ise oral olarak biplastin ve rupadatin, oftalmik uygulamalar için ise bepotastin ve alcaftadin kullanılmaktadır (Simons ve Simons 2011).

Tablo 3. H1 antagonistlerinin istenmeyen etkileri.




Antihistaminikler H1 reseptörlerine bağlanarak alerjik reaksiyonlar, kaşıntı, hapşırma, burun akıntısı gibi nonspesifik semptomlarda baskılanmasında ve nükleer faktör kappaB (NF-kB) üzerinden antijenlerin T lenfositlerine sunumunda azalma ve negatif kemotaksi oluşumunda rol alır. Bununla birlikte iyon kanalları üzerinden de yangı mediatörlerinin salınımını azaltır. Ayrıca H1R ile birlikte farklı reseptörlere bağlanarak istenmeyen etkileri oluşmaktadır (Tablo 3) (Simons 2004).

İkinci nesil antihistaminikler birinci nesile göre kan beyin bariyerini daha az geçer, bu farklıkları lokal veya sistemik tedavide avantaj sağlar. Birinci nesil antihistaminikler merkezi sinir sistemine geçerek H1R üzerinden histamin salınımını baskılar ve uyku bozukluklarının tedavisinde kullanılır (Passani ve Blandina 2011).

H1R gen ekspresyonun alerjik olaylarda arttığı belirlenmiştir. Gen ekspresyonu baskılandığında klinik semptomların hafiflediği gözlenmiştir. H1R'nin duyarsızlaşmasında resöptör regülasyonun azalması en son basamaktır (Fukui ve ark 2016). toluene 2, 4-diisocyanate (TDI) verilerek alerji oluşturulan ratlarda epinastin,

d-klorfeniramin ve olopatadin tedavi dozunda verildiğinde H1R'nin ve IL-4'nün mRNA düzeyinde baskılandığı ve gen ekspresyonu baskılanması ile semptomların azaldığı gözlenmiştir (Mizuguchi ve ark 2008).

## 3.H1R Antagonistlerinin Kardiyatoksik Etkileri

EKG'de QT intervali ventriküler hücrelerin aksiyon potansiyeline (AP) göre belirlenir. AP ise hücrelere iyon giriş-çıkışı ile şekillenmektedir. $Na^+$ ve $Ca^+$ iyonları depolarizasyon yaparken, $K^+$ çıkışı repolarizasyondan sorumludur. Faz 0; $Na^+$ kanallarının hızlı bir şekilde aktive olmasıyla $Na^+$ hücre içine girişiyle şekillenir. $Na^+$ kanalı Nav1.5 geni ile kodlanır ve bu gendeki defektler uzun QT sendromu tip 3'e sebep olur. Faz 1; $I_{to1}$ ve $I_{to2}$'yle hücre dışına $K^+$ çıkışıyla şekillenir. Faz 2; $Ca^+$ kanallarının yavaş bir şekilde inaktive olması ile şekillenir. $Ca_v1.2$ ve $Ca_v3.2$ genleri ile kodlanır. Faz 3; $IK_s$ (yavaş) $IK_r$ (hızlı) ve $IK_1$ üç farklı kanal sistemi ile repolorizasyon şekillenir.

- $IK_s$ $K_v7.1$ ve KCNE1
- $IK_r$ $K_v11.1$(hERG1) ve KCNE2 (MiRP)
- $IK_1$ $K_{ir}2.1$ genleri ile kodlanır (Abriel ve ark 2004).

$K_v7.1$ genindeki mutasyonlar uzun QT sendromu 1 ile ilişkilidir, Aynı zamanda bu sendrom Romano-Ward sendromu olarak da bilinir (Ncbi-a). $K_v7.1$ geni gibi KCNE1 geni de $IK_s$ oluşumundan sorumludur. Bu gende şekillenen mutasyonlar Jervell-Lange-Nielsen ve Romano-Ward sendromları ile ilişkilidir (Ncbi-b) $K_v11.1$ geninde şekillenen mutasyonlar uzun QT sendromu tip 2'ye neden olabilir (Ncbi-c). KCNE2 geni de $IK_r$ oluşumundan sorumludur ve bu gende meydana gelen mutasyonlar kardiyak aritmi ile ilişkilidir (Ncbi-d). $K_{ir}2.1$ geninde şekillenen mutasyonlar periyodik felç, kardiyak aritmiler ve dismorfik özellik ile karakterize olan Andersen sendromu ile ilişkilendirilmektedir (Ncbi-e).

Kalpteki tanımlanan en az 8 tane K kanalı bulunmaktadır. Farklı açılma ve kapanma özelliklerinin yanı sıra hızlı veya yavaş açılmaları, açılma sıklıkları açılma voltajları gibi özellikleri ile birbirinden ayrılırlar. Bu akımların her biri AP üzerinde farklı etki gösterir. Normal koşullarda AP'nin repolarizasyonuna katılan ana akımlar $I_{Kr}$, $I_{Ks}$, $I_{Ki}$ ve $I_{to}$'dur (Dávila ve ark 2006).

K kanalları türlere göre farklılık göstermektedir. $IK_r$ kedi, köpek, kobay, rat, insan, fare ve tavşanda bulunurken, $IK_s$ köpek, kobay, insan ve tavşanda bulunur. Diğer K kanalları, aynı zamanda, atriya ve purkinje liflerindeki asetilkolinle aktive edilmiş $IK_{Ach}$ gibi seçici kalp bölgelerinde veya patolojik koşullar altında AP platosunda aktif ATP'ye bağımlı $IK_{ATP}$, Na bağımlı $IK_{Na}$ ve yağ asidi $IK_{FA}$ gibi K kanalları bulunur (Nerbonne ve Kass 2005). İlaca bağlı şekillenen aritmiler temelde hızlı repolarizasyon fazını kontrol eden $I_{Ki}$ ve $I_{kr}$ kanallarının inaktive edilmesi ile şekillenir. Antihistaminiklerin ilk olarak bu iki kanalı etkileyerek TdP'ye neden olduğu düşünülse de asıl kardiyak yan etkilerini $I_{Kr}$ blokajı yaparak ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Dávila ve ark 2006)

Antipsikotikler, antibiyotikler, antimalaryaller, antiaritmikler, antihistaminikler ve antivirallerin human-Ether-go-go-Related Gen (hERG)'yi etkileşime girerek bloke ettiği anlaşılmasıyla piyasada çok sayıda ilacın geri çekilmesine neden olmuştur (Kudaibergenova ve ark 2018) İnsan hERG geni $I_{kr}$ kanalının α alt birimini kodlar ve 15 ekzondan oluşur. hERG kanalları 1159 amino asitten oluşur. hERG kanallarının inhibisyonu kardiyak AP'nin uzamasına sebep olmaktadır. Moleküler biyolojinin gelişimi ile terfenadin ve astemizolun hERG kanallarını inhibe ettiği (Thomas ve ark 2006) ve HERG1 mutasyonlarının repolarizasyonda TdP'yi tetikleyen bir mekanizmaya neden olduğu ifade edilmiştir (Dávila ve ark 2006).

hERG kanalları, K iyonlarının konsantrasyona bağlı olarak hareket etmesini sağlayan bir tetramer içinde bulunur ve dört alt birimden oluşur. Monomerlerin her biri, altı alfa-sarmal transmembran segmentine (S1-S6) ve bir sitoplazmik N- ve C-terminal uçlarına sahiptir. C-terminal ucu, Siklik Nükleotit Bağlama Alanı (CNBD) olarak bilinir ve N-terminal ucu, bir Per-Arnt-Sim (PAS) alanı içerir. CNBD ve PAS uçları, kanal geçişini düzenlemesinde etkin olduğu ifade edilmektedir. S1-S4 voltaj algılama alanını oluştururlar. Özelikle S4 yapısında arjinin ve lizin içermesiyle voltaj sensörü görevini üstlenmektedir. S5-S6 seçici geçirgenlik gösteren por alanını şekillendirir. S4-S5'i birbirine bağlayan yapı voltajın algılanmasına bağlı olarak S5-S6'da por alanında konformasyonel değişikliklere neden olan iletinin iletilmesinde etkindir (Kudaibergenova ve ark 2018). İlaçların hERG kanalını spesifik olarak bloke etmesinde iki nokta üzerinde durulmaktadır; diğer kanallardan farklı olarak,

1- S6'da iki prolin grubu yoktur, bu amino asitler gözenek hacmini önemli ölçüde azaltan bir açıyı indükler. Yokluğunda ise hERG kanallarının kimyasal yapıları sayesinde diğer K kanallarına göre gözenek hacminin ve yayıldıkları alan çok daha fazladır.

2- hERG kanalı yapısında bulunan iki aromatik amino asit (tirozineandilakilanin) sayesinde ilaçlardaki aromatik halkalar ile etkileşime girebilir. Polimorfizme bağlı olarak, bu etkinin artabileceği ve duyarlılık oluşabileceğini anlatan açıklamaları mevcuttur (Dávila ve ark 2006).

H1R antagonistlerinin antikolinerjik ve alfa reseptörler üzerindeki etkileri klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bununla birlikte potansiyel kardiyatoksik etkileri mevcuttur. Antihistaminiklerin kardiyatoksik etkisi doz aşımı veya sitokom P450 enzim yoluyla metabolize olan başka bir ilaçla eş zamanlı kullanımına bağlı olarak plazma konsantrasyonunun artmasından dolayı mevcut kardiyatoksik risk faktörü artmaktadır. Muskaranik reseptörler üzerinden ağız kuruluğu, taşikardi ve üriner retansiyo gibi kolinerjik etkilere sebep olmaktadır (Yayla ve ark 2013).

QT aralığı QRS kompleksinin başlangıcı ile T dalgasının sonu olarak tanımlanır (Abriel ve ark 2004). $QT_c$ değeri genellikle <440 ms iken bu değer kadınlarda biraz yüksek olabilir (<450-460). TdP sendromu H1R antagonistlerinin doz aşımı gibi nedenlerden dolayı plazmadaki konsantrasyonlarının artmasıyla veya metabolize olma kapasitesinin azalması ile ortaya çıkabilmektedir. H1R antagonistlerinin siroz ve alkol kullanımı gibi karaciğer hasarı ile sonuçlanan durumlarda, makrolid antibiyotikler, ketokonazol ve ranitidin-simetidin gibi hepatik enzimleri inhibe eden ilaçlarla eş zamanlı kullanımına bağlı olarak TdP şekillenebilmektedir (Soldovieri ve ark 2008).

Ketokonazol ve terfenadin ile yapılan çalışmada ketokonazolün, terfenadinin metabolizmasını azaltarak kardiyatoksik olan ana bileşiğin birikmesine bağlı olarak QT aralığının uzadığı bildirilmiştir. Çalışmada bireysel farklılığa bağlı olarak ilaç etkileşiminin farklı olduğu gözlenmiştir. Bu olayların TdP için risk faktörü olduğu düşünülmektedir (Honig ve ark 1993). Maymunlarda yapılan çalışmada metabolize olmayan terfenadinin kan konsantrasyonun artmasına bağlı olarak QTc intervalinin arttığı gözlenmiştir (Ohmura ve ark 1999). CYP2D6, bazı antihistaminikler, metaditazin, terfenadin, azelastin, oksatomid, epinastin, sinnarizin, flunarizin, difenhidramin, klorfeniramin, loratadin, prometazin, astemizolün oksidasyonuna önemli bir katkıda bulunur (Zhou 2009). CYP2D6 enzimini kodlayan genler, insan popülasyonunda oldukça polimorfiktir. Bazı aleller, düşük metabolizeli fenotip (DM) ile sonuçlanır. DM'ye sahip bazı bireyler, 2 null alleli taşıdıkları için fonksiyonel proteinleri yoktur veya bireylerde gen olmayabilir. Yüksek metabolizmalı fenotiplerde (YM) ise genin 3 veya daha fazla aktif kopyasına sahip olabilirler. Bu gen için farklı izoformları kodlayan alternatif olarak eklenmiş transkript varyantları bulunmuştur (Ncbi-f)

Difenhidramin, klorfeniramin, klemastin, prometazin, tripelennamin ve hidroksizinle yapılan invitro çalışmada sitokrom P450 izoenim CYP2D6 aracılı bufuralol 19-hidroksilasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. $K_i$ değerlerine göre difenhidramin, klorfeniramin az düzeyde prometazin, tripelennamin ve hidroksizinnin orta düzeyde klemastin yüksek düzeyde enzimi inhibe etmektedir. Çalışmada kullanılan antihistaminiklerin $K_i$ değerleri hepatik kandaki antihistaminik konsantrasyonları aralığında olduğundan, klasik H1R antagonistleri aynı yolağı kullanan kardiyovasküler, antidepresan ve antipsikotik CYP2D6 substratları ilaç-ilaç etkileşimleri gözlenebilir (Hamelin ve ark 1998).

Genotip, genellikle 20–25 polimorfik alanın analizi yapılarak bakılırken bazı bireylerde genotiple fenotipin uyumsuz olduğu gözlenmiştir. Buda sonraki çalışmalarda Amerika'daki Afrikalılarda CYP2D6*36,*40 ve *42 ve Japonlarda CYP2D6*21 ve *44 gibi yeni allellerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Genotiplerin belirlenmesinde etnik köken önemlidir. Kafkasya için fonksiyon kaybına yol açan en yaygın allel CYP2D6*4'tür ve *3, *5, *6, *10 ve * 41 allelleri de fonksiyon kaybına neden olur. Asyalılar ve Afrikalılar'daki fenotipin tahmininde CYP2D6*10 ve *17'nin belirlenmesi, kritik öneme sahip olacaktır (Zhou 2009). Onbeş farklı insanda yapılan çalışmada, CYP2D6 enziminin dokuz kişinin YM olduğu ve 6 tanesinin ise DM olduğu belirlenmiştir. Venlafaksinin ve CYP2D6 enzim inhibitörü difenhidraminin eş zamanlı kullanımına bağlı olarak YM'lılarda plazma venlafaksin ve plazma pik konsantrasyonlarının ortalama değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. DM'lırda tek ve konbine kullanımında benzer veriler alınmıştır. İnhibisyonun etkisi olarak venlafaksinin ortalama plazma konsantrasyonunda iki kat artış gözlenmiştir. Sonuç olarak venlafaksinin kardiyotoksik etkisi artmıştır. Venlafaksin ve difenhidraminin eş zamanlı kullanımı venlafaksin istenmeyen etkilerini arttıracağı ifade edilmektedir (Lessard ve ark 2001)

DM ve YM'lerde difenhidramin ve metoprolol eş zamanlı kullanımına bağlı olarak difenhidraminin CYP2D6'yı inhibe ederek YM'li bireylerde metoprololun klinik etkinliğini arttırdığı, buna bağlı kalp hızındaki

azalmanın plasebo uygulanan bireylerden daha belirgin olduğu ifade edilmektedir. DM'lı bireylerde ise plasebo alan kişiler ile benzer veriler gözlenmiştir. Çalışmaya bakılarak terapötik indeksi dar olan ilaçların YM bireylerde potansiyel yan etkilerinin görülme olasılığı fazla olacağından, ilaç-ilaç etkileşimi göz önüne alınarak doz rejimi ayarlanmasında dikkat edilmesi gerektiği ifade edilmektedir (Hamelin ve ark 2000).

Loratadin gibi bazı antihistaminikler CYP3A4 ve CYP2D6 enzimleri ile elimine olurlar. CYP3A4 yönünden DM sahip bireylerde ilacın etkinliği artabilir (Yumibe ve ark 1996). Feksofenadinin CYP3A4 inhibitörleri, eritromisin ve ketokonazole gibi ilaçlarla birlikte kullanımı plazma konsantrasyonu 2-3 kat artırmaktadır (Paakkari 2002). CYP3A4 ilaç metebolizmasında etkin rol oynamaktadır. Etkinlik kapasitesi bireyler arasında değişiklik gösterse de diğer CYP izoformları (2D6, 2C9 ve 2C19) gibi toplumsal polimorfizm maruz kalmamaktadır. Klaritromisin, diltiazem, eritromisin, greyfurt suyu, itrakonazol ve ketokonazol gibi CYP3A4 inhibitörlerinin astemizol, sisaprid, pimozid veya terfenadin ile birlikte uygulanmasıyla QT intervalinin uzadığı bildirilmiştir (Dresser ve ark 2000).

İlaç-ilaç etkileşimi olabileceği gibi doğuştan QT intervalinin uzun olması, iskemik kalp hastalığı, konjestif kalp yetmezliği veya elektrolit bozukluğu (hipokalemi veya hipomagnezemi) olan hastalar risk altındadır (Woosley 1996). Genetik polimorfizmin predispoze etkisine bağlı olarak az sayıdaki vakada ilaca bağlı uzun QT sendromunun ortaya çıktığı bildirmiştir (Soldovieri ve ark 2008).

Oral kullanılan dozunun %1'den daha azı sistemik dolaşıma gecen terfenadininin, 1981 yılında Committee on Safety of Medicines'e kalp toksisitesi üzerine 773 vaka bildirilmiştir (Davies ve ark 1989). Terfenadinin ana metaboliti olan feksofenadinin HERG veya Kv1.5'i bloke etmediği, terfenadinine bağlı kardiyotoksisitesinin ana bileşiğin birikmesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (Roy ve ark 1996). İnsan atriumundan izole edilen miyositlerde yapılan çalışmada, terfenadinin ve loratadinin $I_{to}$, $I_{sus}$ ve $I_{K1}$ kanalları üzerine etkisi olmadığı, fakat HERG kanallarını yüksek düzeyde bloke ettiği gözlenmiştir (Crumb 2000). Zebra balıklarında yapılan çalışmada terfenadinin antriyoventriküler blok, bradikardi, perikardiyal ödem yaptığı ve insanlardaki kardiyotoksik etkilerle korelasyon içinde olduğu ifade edilmiştir (Zhu ve ark 2014).

Astemizolun yüksek doz kullanımına bağlı olarak QT aralığının uzadığı, buna bağlı olarak polimorfik ventriküler aritminin formu olan TdP geliştiği rapor edilmiştir (Craft 1986). 12 günlük yarı ömre sahip olan astemizol, aktif metaboliti desmetilastemizole metabolize olmaktadır. Desmetilastemizol, kalpteki $IK_r$ kanallarını %65 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. $IK_r$ inhibe olmasıyla QT dalgasında uzama meydana geldiği ifade edilmiştir (Vorperian ve ark 1996).

Ebastininle yapılan çalışmada, sıçan ve kobaydan izole edilen ventriküler kardiyomiyositlerde K kanalları ve insan HERG genin xenopus laevis oositlerine aktarılarak $I_{Kr}$ üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmada K kanallarını bloke düzeyine göre $I_{Kr}$> $I_{Ks}$> $I_{ped}$> $I_{to}$ şeklinde etki ettiği, terfenadinle benzer dozlarda K kanalları üzerine daha düşük düzeyde blokaj yaptığı ifade edilmektedir (Ko ve ark 1997). Ketokonazol ve ebastinin kombine tek doz uygulamalarında kardiyak etki gözlenmemesine rağmen, çoklu uygulamalarda ebastinin kan konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak QT aralığının uzadığı ifade edilmiştir. Aynı şekilde eritromisin ile birlikte tek doz kullanımda kardiyak bir etki gözlenmezken çoklu dozlarda QT aralığının arttığı gözlenmiştir. Aynı kombinasyonların terfenadinle kullanıma bakıldığında terfenadinle çok daha kardiyatoksik olduğu ifade edilmiştir (Moss ve ark 1999). Rupatadinin ketokonazol veya eritromisin eşzamanlı uygulanması rupatadinin konsantrasyonu arttığı gözlenmiştir. (Dávila ve ark 2006). Rupatadinin terapötik ve hücum dozlarında herhangi bir kardiyatoksik etkiye neden olmadığı ifade edilmiştir (Yayla ve ark 2013)

Gönüllülerde feksofenadin ile yapılan çalışmada, $I_{Kr}$ inhibe etmediği QT değerlerinin plasebo verilenlerle aynı olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte eritromisin veya ketokonazol ile kombinasyonunda kardiyatoksik etkinlik gözlenmemiştir (Pratt ve ark 1999). Ayrıca triprolidinin aktif metaboliti akrivaztininin AP'inde değişiklik yapmadığı ifade edilmiştir (Paakkari 2002). Setirizinin önerilen dozun 2 ve 6 kat fazla dozlarında QT aralığında önemli bir değişiklik yapmadığı gözlenmiştir (Sale ve ark 1994). Köpeklerde yapılan çalışmada aynı dozlarda verilen feksofenadin ve terfenadin kardiyak AP'i üzerine etkilerine bakılmıştır. Terfenadin verilen gurupta QT intervali uzadığı feksofenadin verilen grupta ise kardiyatoksik etkinlik gözlenmemiştir (Ando ve ark 2018). Halotanlu köpeklerde terfenadinle yapılan başka bir çalışmada benzer bulgular bulunmuştur (Usui ve ark 1998).

Mizolastinin glukuronidasyon yoluyla metabolize olmasına rağmen, ketokonazol ve eritromisinle kombine kullanımı mizolastinin plazma konsantrasyonunu orta derecede artırmaktadır. Simetidin, siklosporin ve nifedipin gibi karaciğer oksidasyonu (sitokrom P450 3A4) substratlarının birlikte kullanılması dikkatle

yapılmalıdır. Normal dozlarında kardiyotoksik etkisi görülmemesine rağmen doz aşımında QT intervalinde uzama gözlenmektedir (Dávila ve ark 2006).

## 4.Sonuç ve Öneriler

Antihistaminik kaynaklı kardiyak yan etkiler ilaç kaynaklı olabileceği gibi genetik kaynaklıda olabilmektedir. İlaç kaynaklı etkilerini hERG kanalının blokajı şeklinde gösterirken, genetik kaynaklı etkilerini karaciğer enziminin bireyler arasında farklılık göstermesine ve iyon kanallarındaki mutasyonun predispoze etkisiyle ortaya çıkabilir. Kardiyak hastalık riski olan hastalarda ilaç-ilaç etkileşimine daha çok dikkat edilmelidir.

## Teşekkür

Bu derlemenin hazırlanmasında destek ve yardımlarından dolayı Farmakoloji ve Toksikoloji ABD Üyesi Prof. Dr. Enver YAZAR' a teşekkür ederim.

## 5.Kaynaklar

Abriel H, Schlapfer J, Keller DI, Gavillet B, Buclin T, Biollaz J, Stoller R, Kappenberger L, 2004. Molecular and clinical determinants of drug-induced long QT syndrome: an iatrogenic channelopathy. Swiss medical weekly, 134, 47-48, 685-94.

Ando K, Nakamura Y, Hagiwara-Nagasawa M, Harada H, Miyamoto H, Inamura N, Takagi K, Goto A, Chiba K, Lubna NJ, 2018. Comparison of electropharmacological effects between terfenadine and its active derivative fexofenadine using a cross-over study in halothane-anesthetized dogs to analyze variability of pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles of terfenadine and torsadogenic risk of fexofenadine. The Journal of toxicological sciences, 43, 3, 183-92.

Chen C, Hanson E, Watson JW, Lee JS, 2003. P-glycoprotein limits the brain penetration of nonsedating but not sedating H1-antagonists. Drug Metabolism and Disposition, 31, 3, 312-8.

Craft TM, 1986. Torsade de pointes after astemizole overdose. British medical journal (Clinical research ed.), 292, 6521, 660.

Crumb WJ, 2000. Loratadine blockade of K+ channels in human heart: comparison with terfenadine under physiological conditions. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 292, 1, 261-4.

Dale HH, Laidlaw PP, 1910. The physiological action of β-iminazolylethylamine. The Journal of Physiology, 41, 5, 318-44.

Davies AJ, Harindra V, McEwan A, Ghose R, 1989. Cardiotoxic effect with convulsions in terfenadine overdose. BMJ: British Medical Journal, 298, 6669, 325.

Dávila I, Sastre J, Bartra J, Del Cuvillo A, Jáuregui I, Montoro J, Mullol J, Valero A, 2006. Effect of H1 antihistamines upon the cardiovascular system. J Investig Allergol Clin Immunol, 16, 1, 13-23.

Dresser GK, Spence JD, Bailey DG, 2000. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. Clinical pharmacokinetics, 38, 1, 41-57.

Fukui H, Mizuguchi H, Nemoto H, Kitamura Y, Kashiwada Y, Takeda N, 2016. Histamine H 1 Receptor Gene Expression and Drug Action of Antihistamines. In: Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease. Eds: Springer, p. 161-9.

Greaves MW, 2005. Antihistamines in dermatology. Skin pharmacology and physiology, 18, 5, 220-9.

Hamelin BA, Bouayad A, Drolet B, Gravel A, Turgeon J, 1998. In vitro characterization of cytochrome P450 2D6 inhibition by classic histamine H1 receptor antagonists. Drug metabolism and disposition, 26, 6, 536-9.

Hamelin BA, Bouayad A, Méthot J, Jobin J, Desgagnés P, Poirier P, Allaire J, Dumesnil J, Turgeon J, 2000. Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 67, 5, 466-77.

Handley DA, Magnetti A, Higgins AJ, 1998. Therapeutic advantages of third generation antihistamines. Expert opinion on investigational drugs, 7, 7, 1045-54.

Hill S, Ganellin C, Timmerman H, Schwartz J, Shankley N, Young J, Schunack W, Levi R, Haas H, 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. Pharmacological reviews, 49, 3, 253-78.

Holgate ST, Canonica G, Simons F, Taglialatela M, Tharp M, Timmerman H, Yanai K, Allergy TCGwcutaotBSf, Immunology. C, 2003. Consensus Group on New-Generation Antihistamines (CONGA): present status and recommendations. Clinical & Experimental Allergy, 33, 9, 1305-24.

Honig PK, Wortham DC, Zamani K, Conner DP, Mullin JC, Cantilena LR, 1993. Terfenadine-ketoconazole interaction: pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. Jama, 269, 12, 1513-8.

Kim J, Ogai A, Nakatani S, Hashimura K, Kanzaki H, Komamura K, Asakura M, Asanuma H, Kitamura S, Tomoike H, 2006. Impact of blockade of histamine H2receptors on chronic heart failure revealed by retrospective and prospective randomized studies. Journal of the American College of Cardiology, 48, 7, 1378-84.

Ko CM, Ducic I, Fan J, Shuba YM, Morad M, 1997. Suppression of mammalian K+ channel family by ebastine. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 281, 1, 233-44.

Kudaibergenova M, Perissinotti LL, Noskov SY, 2018. Lipid roles in hERG function and interactions with drugs. Neuroscience letters.

Lessard É, Yessine M-A, Hamelin BA, Gauvin C, Labbé L, O'hara G, LeBlanc J, Turgeon J, 2001. Diphenhydramine alters the disposition of venlafaxine through inhibition of CYP2D6 activity in humans. Journal of clinical psychopharmacology, 21, 2, 175-84.

MacGlashan D, 2003. Histamine: a mediator of inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 112, 4, S53-S9.

Mizuguchi H, Hatano M, Matsushita C, Umehara H, Kuroda W, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H, 2008. Repeated pre-treatment with antihistamines causes transcriptional up-regulations of histamine H1 receptor and interleukin-4 genes in toluene-2, 4-diisocyanate–Sensitized rats. Journal of pharmacological sciences, 108, 4, 480-6.

Monczor F, Fernandez N, 2016. Current Knowledge and Perspectives for Histamine H1 and H2 Receptor Pharmacology. Functional Selectivity, Receptor Crosstalk and Repositioning of Classic Histaminergic Ligands. Molecular pharmacology, mol. 116.105981.

Moss A, Chaikin P, Garcia J, Gillen M, Roberts D, Morganroth J, 1999. A review of the cardiac systemic side-effects of antihistamines: ebastine. Clinical & Experimental Allergy, 29, S3, 200-5.

Ncbi-a. Erişim tarihi October 31 2018. Erişim adresi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3784.

Ncbi-b. Erişim tarihi October 31 2018. Erişim adresi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3753.

Ncbi-c. Erişim tarihi October 31 2018. Erişim adresi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3757.

Ncbi-d. Erişim tarihi October 31 2018. Erişim adresi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9992.

Ncbi-e. Erişim tarihi October 31 2018. Erişim adresi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3759.

Ncbi-f. Erişim tarihi 7 November 2018. Erişim adresi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1565#bibliography.

Nerbonne JM, Kass RS, 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. Physiological reviews, 85, 4, 1205-53.

Ohmura T, Chachin M, Tarui S, Nagakura A, Igarashi T, Ikeda H, Ikegami K, Kitagawa H, Uchida S, 1999. Effects of terfenadine, astemizole and epinastine on electrocardiogram in conscious cynomolgus monkeys. European journal of pharmacology, 378, 2, 169-75.

Paakkari I, 2002. Cardiotoxicity of new antihistamines and cisapride. Toxicology letters, 127, 1-3, 279-84.

Passani MB, Blandina P, 2011. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. Trends in pharmacological sciences, 32, 4, 242-9.

Pratt CM, Mason J, Russell T, Reynolds R, Ahlbrandt R, 1999. Cardiovascular Safety of FexofenadineHCl. The American journal of cardiology, 83, 10, 1451-4.

Randall KL, Hawkins CA, 2018. Antihistamines and allergy. Australian prescriber, 41, 2, 41.

Roy M-L, Dumaine R, Brown AM, 1996. HERG, a primary human ventricular target of the nonsedating antihistamine terfenadine. Circulation, 94, 4, 817-23.

Sale ME, Barbey JT, Woosley RL, Edwards D, Yeh J, Thakker K, Chung M, 1994. The electrocardiographic effects of cetirizine in normal subjects. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 56, 3, 295-301.

Seifert R, Wenzel-Seifert K, 2002. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 366, 5, 381-416.

Simons FER, 2004. Advances in H1-antihistamines. New England Journal of Medicine, 351, 21, 2203-17.

Simons FER, Simons KJ, 2011. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 128, 6, 1139-50. e4.

Soldovieri MV, Miceli F, Taglialatela M, 2008. Cardiotoxic effects of antihistamines: from basics to clinics (… and back). Chemical research in toxicology, 21, 5, 997-1004.

Takahama H, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Sasaki H, Wakeno M, Kim J, Asakura M, Takashima S, Minamino T, 2010. A histamine H 2 receptor blocker ameliorates development of heart failure in dogs independently of β-adrenergic receptor blockade. Basic research in cardiology, 105, 6, 787-94.

Thomas D, Karle C, Kiehn J, 2006. The cardiac hERG/IKr potassium channel as pharmacological target: structure, function, regulation, and clinical applications. Current pharmaceutical design, 12, 18, 2271-83.

Usui T, Sugiyama A, Ishida Y, Satoh Y, Sasaki Y, Hashimoto K, 1998. Simultaneous assessment of the hemodynamic, cardiomechanical, and electrophysiological effects of terfenadine on the in vivo canine model. Heart and vessels, 13, 2, 49-57.

Vorperian VR, Zhou Z, Mohammad S, Hoon TJ, Studenik C, January CT, 1996. Torsade de pointes with an antihistamine metabolite: potassium channel blockade with desmethylastemizole. Journal of the American College of Cardiology, 28, 6, 1556-61.

Woosley RL, 1996. Cardiac actions of antihistamines. Annual review of pharmacology and toxicology, 36, 1, 233-52.

Yayla M, Avşar ÜZ, Cansever Z, 2013. The use of New Generation H1 Receptor Blockers and Advantages in Terms of Reliability. Journal of Clinical and Analytical Medicine, 5, 93, 260-8.

Yumibe N, Huie K, Chen K-J, Snow M, Clement RP, Cayen MN, 1996. Identification of human liver cytochrome P450 enzymes that metabolize the nonsedating antihistamine loratadine: formation of descarboethoxyloratadine by CYP3A4 and CYP2D6. Biochemical pharmacology, 51, 2, 165-72.

Zhou S-F, 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance. Clinical pharmacokinetics, 48, 12, 761-804.

Zhu JJ, Xu YQ, He JH, Yu HP, Huang CJ, Gao JM, Dong QX, Xuan YX, Li CQ, 2014. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. Journal of Applied Toxicology, 34, 2, 139-48.

Zimmermann AS, Burhenne H, Kaever V, Seifert R, Neumann D, 2011. Systematic analysis of histamine and N-methylhistamine concentrations in organs from two common laboratory mouse strains: C57Bl/6 and Balb/c. Inflammation Research, 60, 12, 1153-9.

# İnvers ve Nötr Agonist: Antihistaminikler

Rahmi Canbar[1*]

*[1]Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD, Konya, Türkiye

*rahmicanbar@hotmail.com

## Özet

Günümüzde moleküler teknikler çok hızlı gelişim göstermektedir. Gelişen teknikler sayesinde reseptörler, reseptör sonrası olaylar ve yolaklar hakkında daha fazla bilgi edinilmeye başlanmıştır. Klasik olarak bilinen reseptör agonisti ve antagonisti tanımları yanında invers ve nötr agonist tanımları da bildirilmiştir. Bu yapılar sayesinde reseptörler aracılığı ile etkiyen maddelerin etki mekanizmaları daha iyi anlaşılmıştır. Bu bildiride invers ve nötr agonist tanımları antihistaminiklerin etki mekanizmaları üzerinden anlatılmaya çalışılmıştır.

**Anahtar kelimeler**: İnvers agonist, nötr agonist, antihistaminikler

## Invers and Neutral Agonist: Antihistamines

## Abstract

Today, malecular techniques are developing very rapidly. With the help of developing techniques, more information has been gained about receptors, post-receptor events and pathways. Definitions of conventionally known receptor agonists and antagonists as well as inverse and neutral agonist definitions have been reported. By means of these structures, the mechanisms of action of substances acting through receptors are better understood. In this report, the definitions of inverse and neutral agonists are tried to be explained through the mechanism of action of antihistamines.

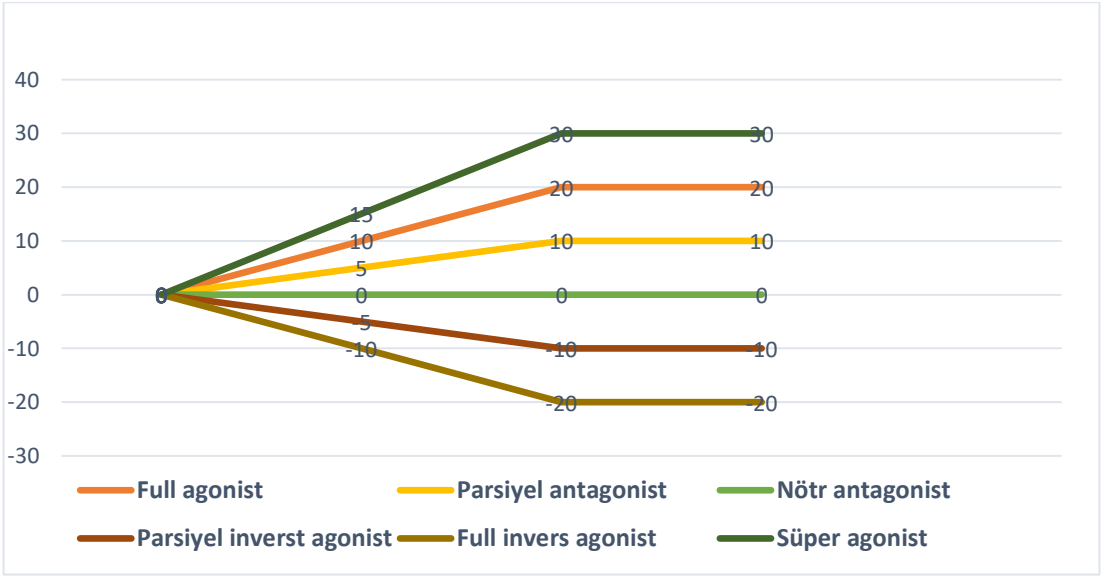
**Keywords:** Invers agonist, neutral agonist, antihistamines

## 1.Giriş

Klasik reseptör-ligand modeline göre ligandın reseptörü işgal etmesiyle sinyal yolağı şekillenmekte ve biyolojik etkinlik oluşturmaktadır. Moleküler biyolojinin ilerlemesiyle birlikte GPRC ailesinin ligantdan bağımsız olarak bazal bir etkinlik oluşturduğu gözlendiği için GPRC ailesini etkileyen ilaçlar yeniden sınıflandırılmıştır.

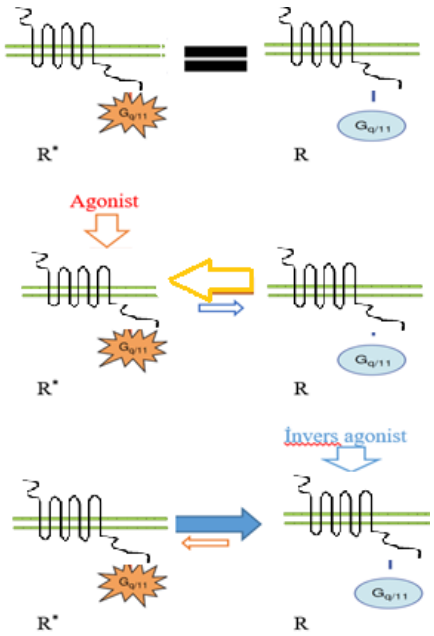
Agonist varlığında GPRC ailesinin etkinliği ve sayısında artış olmaktadır. Temel termodinamik kurallara göre etkinin sonlanması ve reseptör miktarın azalması gerekmektedir. Nötr antagonistlerin (reseptör blokörleri) dengeyi tekrar sağlamaları mümkün değildir. İnaktif durumdaki reseptörleri stabilize ederek ve sayısında artışa neden olarak bazal etkinliğin altında bir etkinliğe sebep olan agonistlere invers agonist ismi verilmektedir (Figür 1) (Milligan 2003). Son çalışmalara göre reseptör antagonistlerin %85 invers antagonist gibi davrandığı ifade edilmiştir (Bond ve IJzerman 2006).

Reseptörler GTP-GDP içermelerine göre aktif veya inaktif olarak isimlendirmektedir. GTP'den GDP izomeralasyonunu artıran ligandlar etki güçlerine göre tam veya parsiyel agonist olarak isimlendirilir. Tam tersi durum olan GTP'den GDP izomeralasyonunu azaltanlar ise tam veya parsiyel invers agonist olarak isimlendirilir. Nötr antagonistler aktif veya inaktif reseptörler arasındaki dengeyi ve biyolojik etki kapasitelerini değiştirmezler, ligandların inhibitör ve stimülatör etkilerini engellerler (Figür 2) (Seifert ve Wenzel-Seifert 2002).




Figür 1. GPCR ligandlarının doz-cevap eğrileri ve bağıl etkinlik spektrumu.

İnvers agonistler konstitütif reseptörleri inaktif durumda stabilize ederek etkilerini inhibe ederler. Reseptör blokajı yapan ilaçlar ise konstitütif etkileri inhibe edemezler (Lefkowitz 2007). İnaktif (R) ve aktif ($R^*$) reseptör sayısı canlıda dinamik bir denge halindedir. Ligandın reseptöre bağlanma miktarına göre dengenin korunması için $R^*$ reseptörler R forma, R reseptörler $R^*$forma dönüşebilir (Leurs ve ark 2002)
İnvers agonist ifadesi Cubic ternary complex (CTCM), extended ternary complex (ETC) ve two-state (TS) modeline göre açıklanmaya çalışılmıştır. TS modeline göre R formunda G proteinlerinden ayrıdır, $R^*$ formundaki reseptörler G proteinleri ile birleşebilir ve etkinlik oluşturabilir (Seifert ve Wenzel-Seifert 2002). İnvers agonistlerin, LR (ligandın etkisinde inaktif reseptör) forma dönüşerek etki ettiği ifade edilmiştir. ETC modeline göre $R^*G$ (G proteinine bağlı konstitütif reseptör) formundaki reseptörler $LR^*$ (liganda etkisinde konstitütif reseptör) ve LR formuna dönüşerek, CTC modeline göre $R^*G$ formundaki reseptörler $LR^*$, LR ve LRG (ligandın etkisinde inaktif G proteine bağlı reseptör) formuna dönüştürerek etki ettiği belirtilmiştir (Monczor ve ark 2013).

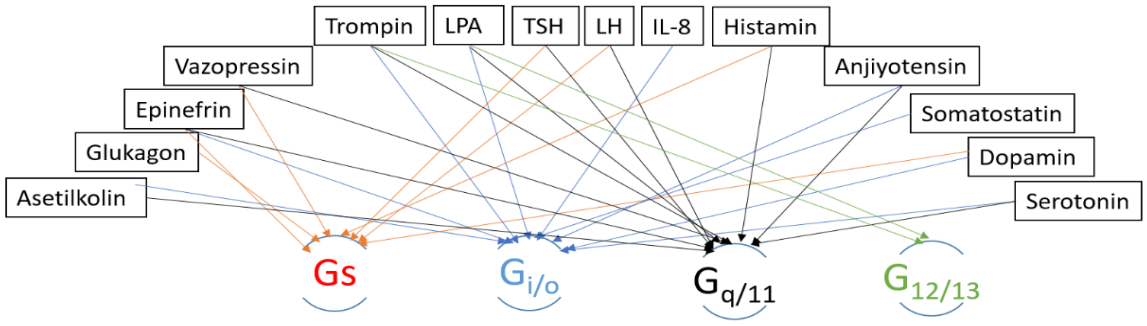



Figür 2. İnvers agonistlerin muhtemel mekanizması.

## 2.Histamin Reseptörleri

### 2.1.Konstitütif Reseptörler

GPRC üç lobu ve N terminal ucu ektrasellüler ortamda üç lobu ve C terminal ucu intraselluler ortamda bulunan reseptörlerdir (Seifert ve Wenzel-Seifert 2002). GPRC hormonlar, nörotransmitter maddeler, kemokin proteinleri, otokrin hormonlar ve parakrin hormonlar gibi ligandların bağlandığı ve 4 temel alt tipten oluşan reseptör ailesidir (Figür 3) (Neves ve ark 2002).




Figür 3. Farklı ligandların etki ettiği GPRC alt tipleri.

Reseptörlerin G proteinlerine bağlanma noktaları araştırılırken bazı reseptörlerin agonist yokluğunda bile aktif oldukları keşfedilmiştir. Bu reseptörlere yapısal olarak aktif mutant reseptör (Konstitütif reseptör) ismi verilmiştir. Bu mutasyona klasik örnek olarak $\alpha_{1B}$-adrenerjik ve H2 reseptörleri verilebilir (Lefkowitz 2007). Konstitütif reseptörler intrasellüler üçüncü lobun sonundaki bölgede ve helix beşin başlangıç gölgesinde meydana gelen mutasyonla şekillenir. GPRC ailesindeki reseptörlerin hemen hemen hepsi konstitütif aktivite gösterebilme kapasitesine sahiptir. Agonistin konstitütif reseptöre bağlanması, var olan biyolojik cevabı güçlendirir (Milligan 2003). Reseptörlere mutasyonlar dışında konstitütif aktiviteyi kazandıran tek nükleotit polimorfizmleri, ekleme varyantları ve reseptör otoantikorları gibi başka yollar da vardır. Reseptörü kodlayan mRNA'nın intronlarında ekleme varyantları farklı izoformlar oluşturur (Bond ve IJzerman 2006).

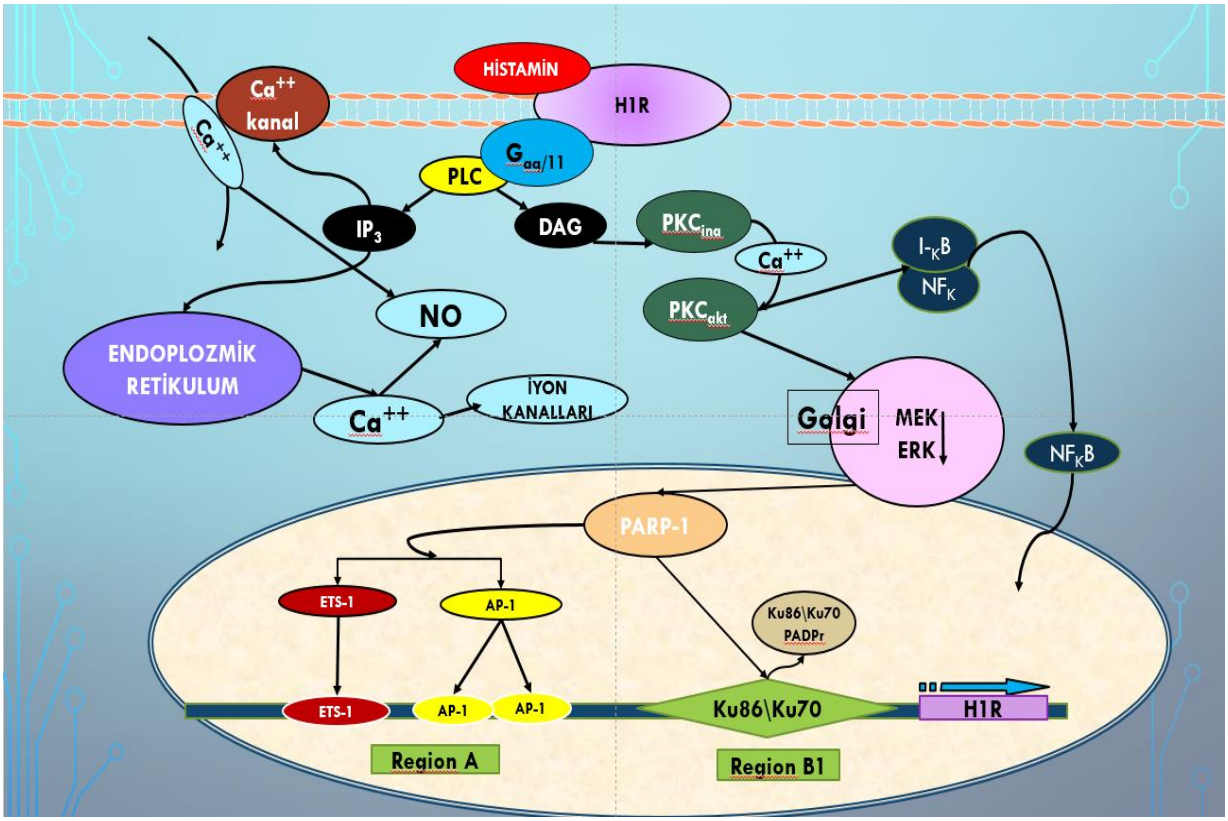
İnvers ve nötral antagonizmaya örnek olarak antihistaminiklerin histamin reseptörleri üzerindeki etkinlikleri örnek verilebilir.

#### 2.1.1.Histamin 1 Reseptörü (H1R)

İnsan H1R genin lokasyonu 3. kromozomun p25 koludur ve 487 aminoasitle G proteine-bağlı (GPCR) histamin reseptörünü kodlar. H1R ağırlıklı olarak $G_{\alpha q/11}$ protein çiftine sahiptir ve fosfolipaz C (PLC)'yi aktive eder. PLC aktive olduktan sonra ikincil mesaj yolaklarından inositol trifosfat (IP3) ve diasilgliserolün (DAG) salınır ve bunu protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ile $Ca^{+2}$ kanalları aktivasyonu takip eder. $Ca^{+2}$ –Na değişimi ile hücre içi $Ca^{+2}$ düzeyi artar (Hill ve ark 1997). Ayrıca H1R araşidonik asit, nitrik oksit ve cGMP yolaklarını da kullanır (Passani ve Blandina 2011).

Ligandın G proteinlerine uzun süreli veya tekrarlayan dozlarda bağlanması ile oluşan duyarsızlaşmasında temel etmenin G proteinine bağlı reseptör kinaz (GRK)-2 olduğu gözlenmiştir (Monczor ve Fernandez 2016). Ratlarda toluen 2,4 diizsosicyanat (TDI) verilerek oluşturulan alerjik reaksiyonlarda histamin reseptörlerinin mRNA düzeyinde artış gözlendiği, buna bağlı olarak reseptörü kodlayan genin aktivasyon düzeyinin alerjik olayların şiddetiyle paralel olabileceği ifade edilmiştir (Mizuguchi ve ark 2008). Histamin reseptöre bağlandıktan sonra aktive olan yolakta PKCδ ve ısı şok proteinleri (HSP90) birleşerek translokasyona uğrar. Golgi cisimciğinde PKCδ-HSP90 kompleksi MEK ERK yolağını etkinleştirerek H1R'nin gen ekspresyonu artar. Özetle H1 reseptör/PKCδ/MEK/ERK/poly(ADP-ribose) polimeras-1 (PARP-1) yolağı ile H1R sayısında artış meydana gelir. Ligandın sürekli verilmesi ile reseptörlerin sayısında azalma olduğu gözlenmiştir.

Reseptör sayısındaki azalma ubikuitin/proteazom sistemine bağlı klatrin aracılığıyla şekillenir. Reseptörlerin yapısındaki 5 proteinin fosforalizisyonunda protein kinaz A, protein kinaz C, protein kinaz G ve kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz II rol oynar (Fukui ve ark 2016).




Figür2: Histaminin H1R'ye bağlanması ile şekillenen sinyal yolağı.

Histamin H1R ve H2R üzerinden endotelyum hücrelerinden nitrik oksit (NO) salınımı uyararak vazodilatasyon, kızarıklık, vasküler permeabilite artış ve ödeme sebep olur. Bu etkileriyle birlikte pozitif inototrop etki, kan basıncında ve perifer damar direncinde azalma gözlenir. Ayrıca H1R üzerinden solunum sistemindeki düz kaslarda kasılma, kalp üzerine pozitif kronotropik etki, sinir uçlarında uyarılma ile deri ve mukozada kaşıntıya sebep olur (Simons 2003).

Agonistin reseptöre bağlanması ile kaşıntı, ağrı, vazodilatasyon, kızarıklık, baş ağrısı, vasküler permabilitede artış, hipotansiyon, taşikardi, bronkokonstriksiyon, atrioventriküler düğümde ileti zamanında azalma, hava yollarındaki vagal sinirler ve öksürük reseptörlerinin uyarılması gibi biyolojik etkinlikler şekillenir. Histamin MSS'ni etkileyerek uyku düzeni, yiyecek alımı, agresif davranışlar veya duygu değişimleri, öğrenme ve hafıza yetilerinde rol almaktadır (Simons 2004).

Histamin reseptörler üzerinden yaptığı biyolojik cevapta tür duyarlılığı vardır. Histamin tavşanlarda H1 reseptörleri üzerinden kalpteki koroner damarlarda vazokonstriksiyona neden olurken, kobaylarda hem vazokonstriksiyon hem de vazodilatasyon meydana getirir. Tavşanlarda histaminin etkisi ile meydana gelen vazokonstriksiyon miyokardiyal aktivitenin artması sonucunda oluşan vazodilatasyon ile maskelenebilir. Buzağılarda vazodeprosör etki H1R'e bağlı vasodilatör ve H2R'ye vasokonstriktör etkinlik arsındaki denge sonucunda şekillenir. Kedi ve köpekte histamine bağlı kan basıncındaki düşüşe hem H1 hem de H2-reseptörlerinin vazodilatasyon etkinliği aracılık eder (Broadley 1975).

### 2.1.2.Histamin 2 Reseptörü (H2R)

İnsanlarda H2R genin lokasyonu 5. kromozomun q35.5 koludur (Haas ve ark 2008). Molekül ağırlığı 40 kDa'dır ve 359 aminoasit ile GPRC ailesine kodlanır (Greaves 2005). Histaminin H2R'ye bağlanması ile AC

yolağı aktifleşir. Protein kinaz A ve transkripsiyon faktör CREB aktifleşmesi ile hücre içi cAMP seviyesi artar. cAMP seviyesinin artması hücreyi hiperpolarize haline geçirir ve biyolojik yanıt şekillenir (Haas ve ark 2008). Histaminin H2R'ye olan affinitesi H3R ve H4R'ye göre daha düşük seviyede iken H2R'nin cAMP üretimi daha yüksektir. Bununla birlikte bazı hücrelerde H1R'deki gibi $G_{q/11}$ yolağını aktive ederek IP3 sentezi ve bunun sonucunda hücre içi $Ca^{+2}$ miktarını arttırabilir. Histaminin H2R'yi aktive etmesi ile birlikte fosfolipaz A2'yi inhibe ettiği ve araşidonik asit sentezini ise artırdığı gözlenmiştir. H2R aktivasyonu miyeloid hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminden sorumlu enzim olan NADPH oksidaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Monczor ve Fernandez 2016).

Agonistin reseptöre bağlanması ile hipotansiyon, kızarıklık, baş ağrısı, taşikardi, pozitif kronotropik ve inotropik etki, bronkodilatasyon, hava yollarında mukus üretimi, gastrik asit salgısı ve vasküler permabilitede artış şekillenir. MSS'inde ise nöröendokrin aktiviteyi güçlendirir (Simons 2004). H2R kalp üzerinde β adrenerjik reseptöre benzeyen etkileri vardır. Histaminin resöptöre bağlanması ile pozitif inototropik ve kronotropik etki şekillenir. H2R bu etkileri ile miyokardiyal iskemi, hipertansiyon, miyokardiyal enfarktüs ve konjestif kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarla direkt olarak bağlantılıdır. Kardiyomiyosit apoptosisini indükleyerek miyokardiyal iskemiye zemin hazırlar (Kim ve ark 2006).

Vazoditasyona bağlı olarak gelişen kan basıncındaki azalma, baroreseptörlerin refleks etkisi ile gizlense de pozitif inotropik ve kronotropik etkisi bununla birlikte negatif dromotropik etki kalp üzerine direkt etkileyerek aritmiye sebep olur. Bu olaylar büyük ölçüde kalp üzerindeki H2R aktivasyonu sonucu şekillenmektedir (Taglialatela ve ark 1999).

### 2.1.3.Histamin 3 Reseptörü (H3R) ve Histamin 4 Reseptörü (H4R)

H3R'ü, 1983 yılında merkezi sinir sisteminde histamin nöronları üzerinde bulunan ve uyarımla salınan histaminin kontrolünü sağlayan presineptik oto reseptör olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonrasında merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde bulunan antihistaminerjik bir presinaptik heteroresoptör olarak tanımlanmıştır (Monczor ve ark 2013). İnsanlarda H3R genin lokasyonu 20. kromozomun q13.33 koludur ve 445 aminoasit ile GPRC ailesine kodlanır ve molekül ağırlığı 70 kDa'dır. Histaminin reseptöre bağlanması ile hücre içi AC ve cAMP seviyesi azalır. Biyolojik etkinlik olarak histamin salınımı ve sentezini inhibe eder. H4R biyolojik etkinliği ve çalışma mekanizması olarak H3R'ye benzer ancak H4R periferik hücreler ve dokularda yaygın olarak bulunur (Haas ve ark 2008). H3R histamin salınımı bloke ederek abartılı brokokonstriksiyonun önüne geçer. Presinaptik heteroreseptör olduğu için histamin, dopamin, serotonin, noradrenalin ve asetilkolin salınımı da baskılar (Simons 2004).

### 3.Antihistaminiklerin İnvers Agonist Etkinliği

Son çalışmalarda antihistaminiklerin reseptör blokajından daha ziyade invers agonist olarak sınıflandırılması daha uygun bulunmaktadır.

Antihistaminiklerin bazıları bu denge prensibine göre çalışır. H1R antagonistleri R formundaki reseptörlere bağlanarak proteinleri stabilize eder. Dinamik denge gereği R* formundaki reseptörler R duruma geçerek antagonizma şekillenir. Bazal seviyede oluşan histamin aktivitesini de engeller. Bazı antihistaminikler ise reseptör blokajı yaparak agonist maddenin reseptöre bağlanmasını engeller, fakat bazal seviyede oluşan histamin etkinliğini ortadan kaldırmazlar (Leurs ve ark 2002). H1R antagonisti olan setirizin ve loratadin invers agonist etkinlik gösterirken histabudifen nötr antagonist etkinlik gösterir (Bond ve IJzerman 2006).

İnsanlardaki konstitütif H1R Gβγ yolağını ve histamin aracılı H1R $G\alpha_{q/11}$ yolağı etkinleşerek NF-$_K$B uyarılır. Uyarıma bağlı olarak aktif hale gelen NF-$_K$B adezyon proteinleri ve sitokinlerin üretimiyle sorumlu genlerin düzenlenmesinde görev alır. Kliniklerde yaygın olarak kullanılan akrivaztin, difenhidramin, ebastin, epinastin, mizolastin, terfenadin karboksilat, tripelennamin ve triprolidin gibi invers H1R antagonistleri konstitütif NF-$_K$B uyarımını inhibe ederek reseptörlerin ve diğer yangı mediyatörlerinin gen ekspirasyonunu engeller. Mepiraminin ise hem histaminle kompetitif antagonizma göstererek histamin aracılı hem de konstitütif aktiviteye bağlı IP3 ve NF-$_K$B azalttığı gözlenmiştir. Mepiramin bu özelliğinden dolayı tam invers agonist olarak tanımlanabilir (Bakker ve ark 2001) H1R invers agonistlerin etki gücü $pK_i$ değerleri ile ilişkilidir. $pK_i$ değerleri ve $pIC_{50}$ değerleri arasında doğru orantı görülmektedir. Mepiraminin bu davranışı $pK_i$ değeri ile açıklanabilir (Bakker ve ark 2000).

Hamster ovaryum hücreleri inkübe edilerek yapılan çalışmada, simetidin, ranitidin ve burimamid verildiği zaman simetididin ve ranitidinin H2R ve bazal cAMP düzeyini azalttığı, ancak uzun süre verildiğinde

upregulasyon şekillendiği, burimamidin ise gen ekspresyonu ve bazal cAMP düzeyini değiştirmediği gözlemiştir. Bununla birlikte burimamadin reseptör üzerinde yarışarak endojen histamin, ranitidin ve simetididin etkinliklerini azalttığı gözlenmiştir. İlaçların bu davranışlarına bakıldığında simetidin ve ranitidinin invers agonist, burimamidin ise nötral antagonist olarak ifade edilmiştir (Smit ve ark 1996). İnsan hücrelerinde yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen burimamid parsiyel agonist olarak davranmıştır (Alewijnse ve ark 1998).

H2R antagonistleri genellikle peptik ülser ve gastroözofageal reflü gibi hastalıklarda kullanılmaktadır. H2R antagonistlerinin bazıları simetidin, ranitidin, famotidin ve nizatidindir (Simons ve Simons 2011). Ratlara uzun süreli simetididin verilerek yapılan çalışmada şekillenen upregülasyonun insanlardan daha düşük seviyelerde olduğu ifade edilmiştir. Upregülasyona bağlı olarak ilaca karşı tolerans ve ilaç kullanımı bırakıldığında yoksunluk sendromu belirtileri gözlenebilir. Uzun süreli tedavilerde nötr antagonistler tedavide avantaj sağlayabilir. Rodopsin (konjenital gece körlüğü), PTH-PTHrP (Jansen'in metafizik kondrodisplazisi), LH (erkeklerde erken ergenlik), TSH (hipertiroidizm, toksik tiroid adenomları) ve $Ca^{+2}$ reseptörlerindeki (otozomal dominant hipoparatiroidizm) mutasyona bağlı oluşan reseptör aktivesinin artmasıyla ilişkili hastalıklarda invers agonistler bazal aktiviteyi düşürdükleri için tedavide avantaj sağlayabileceği ifade edilmiştir (De Ligt ve ark 2000).

## 4.Sonuç ve Öneriler

Moleküler teknikler çok hızla gelişmektedir. Bu gelişimlerle birlikte agonist ve antagonist tanımlarında da değişik anlayışların oluşması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Güncel yeni tanımlamalar arasında ise invers ve nötr agonist tanımlamaları bulunmaktadır. Bu tanımlamalar ve mekanizmalar sayesinde bazı ilaçların etki mekanizmaları daha iyi anlaşılabilmektedir.

## Teşekkür

Bu derlemenin hazırlanmasında destek ve yardımlarından dolayı Farmakoloji ve Toksikoloji ABD Üyesi Prof. Dr. Enver YAZAR' a teşekkür ederim.

## 5.Kaynaklar

Alewijnse AE, Smit MJ, Hoffmann M, Verzijl D, Timmerman H, Leurs R, 1998. Constitutive activity and structural instability of the wild-type human H2 receptor. Journal of neurochemistry, 71, 2, 799-807.

Bakker RA, Schoonus SB, Smit MJ, Timmerman H, Leurs R, 2001. Histamine H1-receptor activation of nuclear factor-κB: roles for Gβγ-and Gαq/11-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. Molecular pharmacology, 60, 5, 1133-42.

Bakker RA, Wieland K, Timmerman H, Leurs R, 2000. Constitutive activity of the histamine H1 receptor reveals inverse agonism of histamine H1 receptor antagonists. European journal of pharmacology, 387, 1, R5-R7.

Bond RA, IJzerman AP, 2006. Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. Trends in pharmacological sciences, 27, 2, 92-6.

Broadley KJ, 1975. The role of H1 and H2-receptors in the coronary vascular response to histamine of isolated perfused hearts of guinea-pigs and rabbits. British journal of pharmacology, 54, 4, 511-21.

De Ligt RA, Kourounakis AP, IJzerman AP, 2000. Inverse agonism at G protein-coupled receptors:(patho) physiological relevance and implications for drug discovery. British journal of pharmacology, 130, 1, 1-12.

Fukui H, Mizuguchi H, Nemoto H, Kitamura Y, Kashiwada Y, Takeda N, 2016. Histamine H 1 Receptor Gene Expression and Drug Action of Antihistamines. In: Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease. Eds: Springer, p. 161-9.

Greaves MW, 2005. Antihistamines in dermatology. Skin pharmacology and physiology, 18, 5, 220-9.

Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O, 2008. Histamine in the nervous system. Physiological reviews, 88, 3, 1183-241.

Hill S, Ganellin C, Timmerman H, Schwartz J, Shankley N, Young J, Schunack W, Levi R, Haas H, 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. Pharmacological reviews, 49, 3, 253-78.

Kim J, Ogai A, Nakatani S, Hashimura K, Kanzaki H, Komamura K, Asakura M, Asanuma H, Kitamura S, Tomoike H, 2006. Impact of blockade of histamine H2receptors on chronic heart failure revealed by

retrospective and prospective randomized studies. Journal of the American College of Cardiology, 48, 7, 1378-84.

Lefkowitz R, 2007. Seven transmembrane receptors: something old, something new. Acta physiologica, 190, 1, 9-19.

Leurs R, Church M, Taglialatela M, 2002. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. Clinical & Experimental Allergy, 32, 4, 489-98.

Milligan G, 2003. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. Molecular pharmacology, 64, 6, 1271-6.

Mizuguchi H, Hatano M, Matsushita C, Umehara H, Kuroda W, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H, 2008. Repeated pre-treatment with antihistamines causes transcriptional up-regulations of histamine H1 receptor and interleukin-4 genes in toluene-2, 4-diisocyanate–Sensitized rats. Journal of pharmacological sciences, 108, 4, 480-6.

Monczor F, Fernandez N, 2016. Current Knowledge and Perspectives for Histamine H1 and H2 Receptor Pharmacology. Functional Selectivity, Receptor Crosstalk and Repositioning of Classic Histaminergic Ligands. Molecular pharmacology, mol. 116.105981.

Monczor F, Fernandez N, Fitzsimons CP, Shayo C, Davio C, 2013. Antihistaminergics and inverse agonism: potential therapeutic applications. European journal of pharmacology, 715, 1-3, 26-32.

Neves SR, Ram PT, Iyengar R, 2002. G protein pathways. Science, 296, 5573, 1636-9.

Passani MB, Blandina P, 2011. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. Trends in pharmacological sciences, 32, 4, 242-9.

Seifert R, Wenzel-Seifert K, 2002. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 366, 5, 381-416.

Simons FER, 2003. H1-antihistamines: more relevant than ever in the treatment of allergic disorders. Journal of allergy and clinical immunology, 112, 4, S42-S52.

Simons FER, 2004. Advances in H1-antihistamines. New England Journal of Medicine, 351, 21, 2203-17.

Simons FER, Simons KJ, 2011. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 128, 6, 1139-50. e4.

Smit MJ, Leurs R, Alewijnse AE, Blauw J, Amerongen GVN, Van De Vrede Y, Roovers E, Timmerman H, 1996. Inverse agonism of histamine H2 antagonist accounts for upregulation of spontaneously active histamine H2 receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93, 13, 6802-7.

Taglialatela M, Castaldo P, Pannaccione A, Giorgio G, Genovese A, Marone G, Annunziato L, 1999. Cardiac ion channels and antihistamines: possible mechanisms of cardiotoxicity. Clinical & Experimental Allergy, 29, S3, 182-9.

# Toxicity of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles Against *Daphnia magna*

Feyza ICOGLU AKSAKAL

Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Atatürk University, 25240, Erzurum, Turkey

E-mail: ficoglu@atauni.edu.tr

**Abstract**

In this study, the toxic effects of biologically synthesized silver nanoparticles on *Daphnia magna* (*D. magna*) were examined. Silver nanoparticles used in this work were synthesized by treating $AGNO_3$ with aqueous leaf extract of *Salvia verticillata*, which is a medicinal plant as a source of reductants. The $LC_{50}$ value for silver nanoparticles was detected as 42 ppb. To investigate the acute toxicity of silver nanoparticles on *D. magna*, 0 (Control), 5, 10, 15 and 25 ppb nanoparticle concentrations were applied to neonates for 48 h. Changes in the expression of genes related to growth and reproduction were analyzed using qRT-PCR technique. It was found that short-term exposure to biologically synthesized silver nanoparticles reduced the survival rate and remarkably enhanced the transcription level of several genes related to growth and reproductive systems. The results suggested that plant extract mediated synthesized silver nanoparticles leads to acute toxicity on *D. magna* and their use may not ecofriendly but further research is needed.

**Keywords:** *Daphnia magna*, Gene expression, *Salvia verticillata*, Silver nanoparticles

## INTRODUCTION

One of the most widely used nanoparticles today is silver nanoparticles. Due to their catalytic, antimicrobial and plasmonic properties, these nanoparticles are used in the medical, cosmetic, textile industries and the manufacture of various household items (Pakrashi et al., 2017). The increase in the use of products containing silver nanoparticles leads to the entry and accumulation of these nanoparticles into the aquatic environment (Conine et al., 2017). Therefore, the interaction of silver nanoparticles with aquatic biota, their uptake by living organisms, their accumulation in the body and their effects cannot be ignored. Previous studies have shown that chemically and biologically synthesized silver nanoparticles have toxic effects on aquatic organisms such as zebrafish, rainbow trout, *D. magna*, and green algae (Auclair et al., 2019; Conine et al., 2017; Krishnaraj et al., 2016). In vivo and in vitro acute toxicity studies on cell lines, bacteria, algae, fish and invertebrates have demonstrated that silver nanoparticles increase reactive oxygen derivatives and lipid peroxidation, impair mitochondria and DNA functions, and lead to death by deteriorating reproduction and development (Kim and Ryu, 2013).

*Daphnia magna*, a freshwater crustacean, is one the most sensitive model organism that employed in eco-toxicity tests (Aksakal and Arslan, 2019). In aquatic ecosystem, *D. magna* plays an important role as the first level of the food chain. Therefore, any significant alteration in their population size can be a good indicator of aquatic toxicology. *Salvia*, herbaceous, shrubs and perennial herbs, belonging to Lamiaceae family and contain nearly 1000 species worldwide. Turkish local name of this genus is "Adaçayı". It has some pharmacological properties such as antibacterial, antioxidant, antifungal and carminative and is used in traditional folk medicine in Turkey. Antidiabetic, antiobesity and neuroprotective effects of *Salvia* species have also been reported (Hamidpour et al., 2014). Previously, silver nanoparticles were synthesized using *Salvia officinalis* plant leaf extract by Sehnal et al. (2019). There are some advantages of synthesizing metal nanoparticles using plant extracts compared to chemical synthesis. These advantages include cost-effectiveness, less reaction time, elimination of harmful components. In this study, the toxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *D. magna* was evaluated to determine whether these nanoparticles are environmentally safe and can be used in consumer products and aquaculture.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of Plant Extract and Synthesis of AgNPs

*Salvia verticilllata* was collected from Erzurum, Turkey and washed with tap and distilled water several times. Fresh plants were dried at ambient conditions and grounded into fine pieces. 5 g of the powdered sample was dispersed in 100 mL of DI water and heated to boiling for 1 h. The extract solution was filtered by using Whatman filter paper. The filtered extract was stored at 4 $^{o}$C.

After preparation of plant extract, it was employed in the synthesis of AgNPs. In a typical synthesis procedure, 100 mL of plant extract solution was mixed with 100 mL of $AgNO_3$ (10 mM) solution and kept in a shaker under mild stirring at 25 $^{o}$C. The growth of the nanoparticles was monitored via UV-vis absorption spectrophotometer. After completion of the reaction in 3 h, the suspension was centrifuged (15000 rpm for 20 min), and dispersed in DI water.

### Test organisms and maintenance

*D. magna* were maintained at the Agricultural Biotechnology Laboratory in Agriculture Faculty (Erzurum, Turkey) following the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) test guideline 202. Daphnids were incubated in 3 L glass beakers containing 2 L aerated tap water with a 16 : 8 (light : dark) photoperiod. They were kept at 20 ± 1 °C with a dissolved oxygen concentration of 6.4 ± 0.5 mg/L and pH value was adjusted in the range 8.2 ± 0.2.

Acute toxicity test conditions, total RNA isolation, cDNA synthesis, and qRT-PCR experiments were performed as described in my previous study (AKSAKAL, 2019). The acute (48 h) toxicity tests were carried out according to the methods described in OECD guideline 202. Daphnids were not fed during the acute toxicity test. Primers used in the real-time PCR assays were selected from previous studies (Blewett et al., 2017; Liu et al., 2017).

#### *Statistical analysis*

All of the data in this study were given as mean ± standard deviation (SD), and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range tests was performed to detect the differences between the control and exposure groups. For gene expression analysis, significant differences between control and exposure groups were determined using Student's t-test provided by Qiagen Gene Globe Data Analysis Center. Statistical significance was assessed at *$P < 0.05$ and **$P < 0.01$ levels.

## RESULTS AND DISCUSSION

TEM images and UV-vis absorption spectra of biologically synthesized AGNP were presented in Fig. 1 and Fig. 2. TEM images demonstrated that AGNPs were mostly spherical and the size of the particles ranging from 20 to 100 nm. The survival rate of *D. magna* was summarized in Fig. 3. In comparison to the control group, exposure to AgNP significantly decreased survival rate in a dose-dependent manner. In consistent with our results, previous studies demonstrated that exposure to various AgNPs led to decrease in survival rate of *D. magna* (Sakka et al., 2016; Zhao and Wang, 2011).

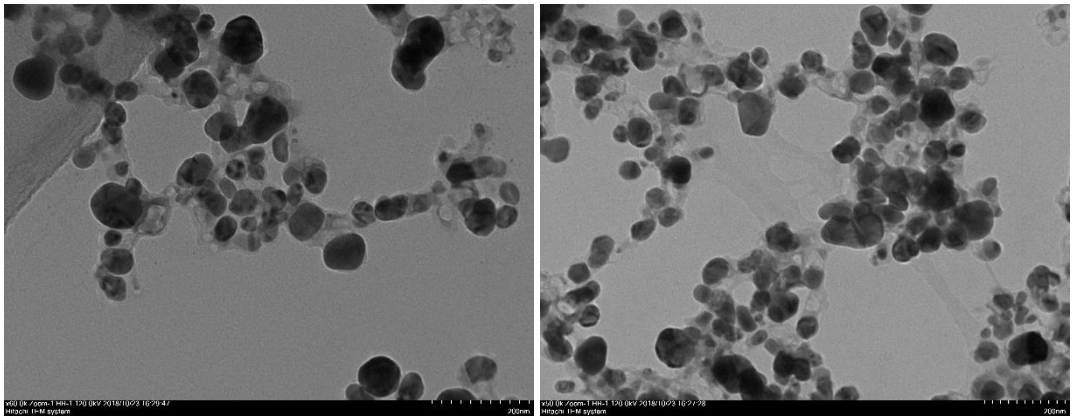


**Fig. 1.** The TEM image of AgNPs

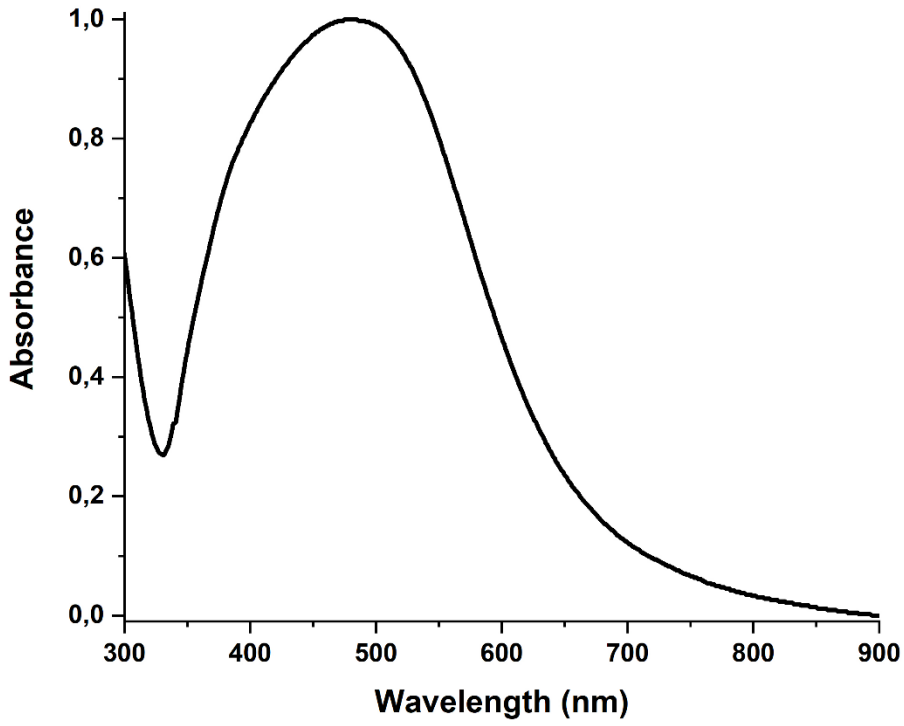



**Fig. 2.** Uv-vis spectra of biologically synthesized AgNPs

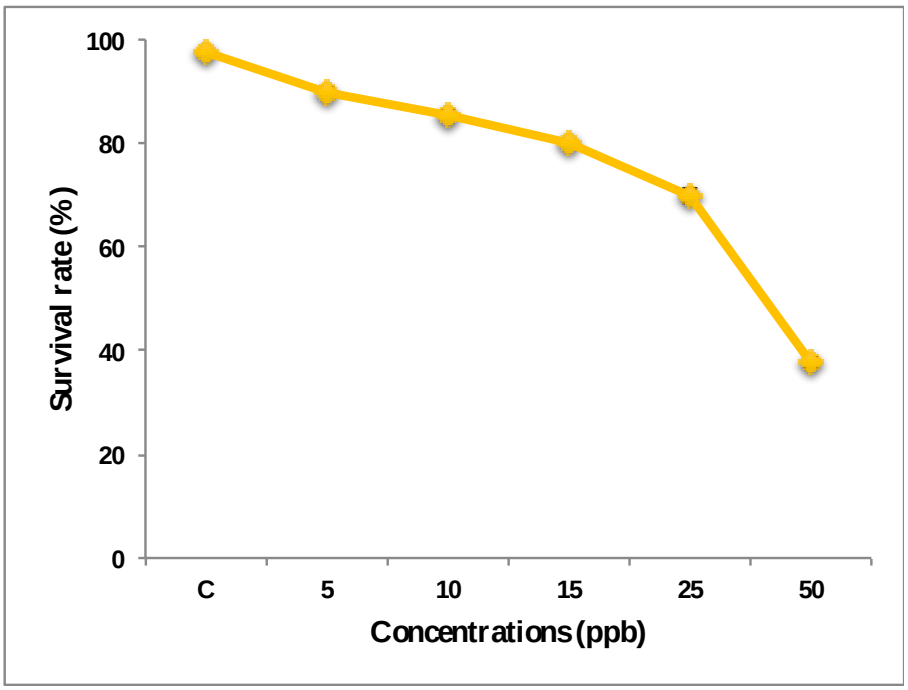



**Fig 3.** Survival rate of *D. magna* exposed to AgNPs

Previous studies revealed that many environmental pollutants could change the expression of reproductive system genes (Aksakal and Arslan, 2019; Liu et al., 2017). In this study, to evaluate the effects of AgNP on *D. magna* growth and reproduction, the expression levels of 4 genes involved in growth and reproductive system were measured (Fig. 4). It was detected that AgNP significantly changed expressions of cut, cyp314, dmrt93 and vtg genes. The expression of the cut gene increased in all AgNP application groups. Blewett et al. (2017) stated that cuticle protein is produced by the epidermis during embryogenesis and is renewed during molting. Besides, this protein participates in the exoskeleton formation in *D. magna* and plays a crucial role in the early development (Jeong et al., 2013). The increase in the *cut* expression may be part of the spawn and die approach observed in many invertebrates in response to exposure to a toxic substance (Kim et al., 2011a; Kim et al., 2011b). The *dmrt93* gene is involved in the alteration process in the reproductive strategy. Exposure to biologically synthesized AgNP significantly induced the expression of this gene at 48 h. Kim et al. (2011a) reported that *Daphnia magna* switches between sexual and asexual reproduction depending on environmental conditions, and changes in *dmrt93* gene expression occur in this process. In this study, vtg gene expression was induced in 15 and 25 ppb AgNP application groups. Vitellogenin gene products in *D. magna* provide as storage proteins providing nutrients to the developing embryos (Jeong et al., 2013). Schlotz et al. (2016) reported that *vtg* gene expression is related to egg production. The induction of *vtg* gene expression upon NP exposure suggests that AgNP affects egg production, and reproduction in *D. magna*. The *cyp314* gene is a gene that is involved in the biosynthesis of principal molting hormone and subcategorized into mitochondrial *cyps* (Le et al., 2010; Wang et al., 2016). Previous researchers have been used *cyp314* gene as a biomarker to describe the effects of toxic substances on *D. magna* molting (Blewett et al., 2017; Liu et al., 2017). In the present study, the expression of *cyp314* gene showed increase in the highest concentration. This indicated that biologically synthesized AgNP affected the molting and reproduction process of *D. magna*. As a conclusion, this investigation revealed that exposure to biologically synthesized AgNP can affect the survival rate, growth and reproduction in *D. magna*.

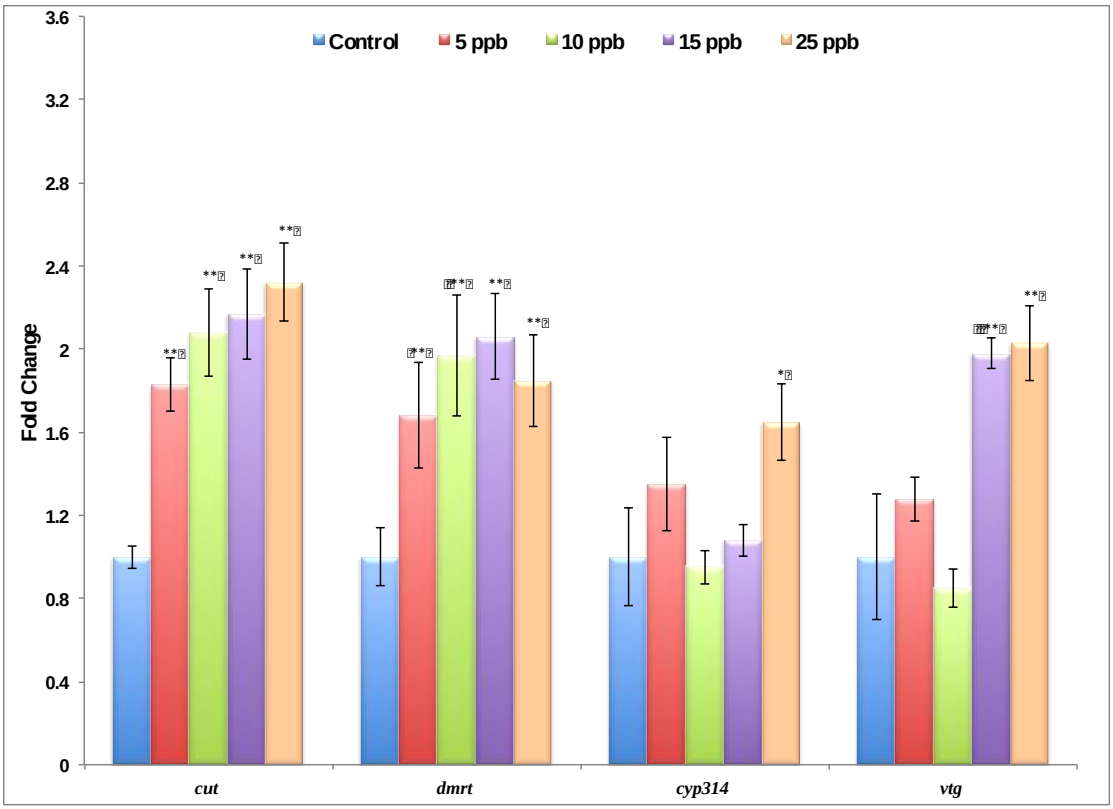



**Fig. 4.** Gene expression (fold change) of *cut*, *dmrt*, *cyp314* and *vtg* of *Daphnia magna* after exposure to AgNPs. Data presented as mean±standart deviation (SDM) of three independent replicates. Asterisks: **** and ** indicate significant change with p < 0.05 and p < 0.01.***

## References

Aksakal FI, Arslan H 2019. Detoxification and reproductive system-related gene expression following exposure to $Cu(OH)_2$ nanopesticide in water flea (*Daphnia magna* Straus 1820). Environmental Science and Pollution Research: 1-9.

Aksakal Fİ 2019. Acute and chronic effects of thifluzamide on *Daphnia magna*. Turkish Journal of Zoology 43: 554-559.

Auclair J, Turcotte P, Gagnon C, Peyrot C, Wilkinson K, Gagné F 2019. The influence of surface coatings on the toxicity of silver nanoparticle in rainbow trout. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 226: 108623.

Blewett TA, Delompre PLM, He YH, Folkerts EJ, Flynn SL, Alessi DS, Goss GG 2017. Sublethal and reproductive effects of acute and chronic exposure to flowback and produced water from hydraulic fracturing on the water flea *Daphnia magna*. Environmental Science & Technology 51: 3032-3039.

Conine AL, Rearick DC, Xenopoulos MA, Frost PC 2017. Variable silver nanoparticle toxicity to Daphnia in boreal lakes. Aquatic Toxicology 192: 1-6.

Hamidpour M, Hamidpour R, Hamidpour S, Shahlari M 2014. Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (*Salvia*) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer. Journal of traditional and complementary medicine 4: 82-88.

Jeong SW, Lee SM, Yum SS, Iguchi T, Seo YR 2013. Genomic expression responses toward bisphenol-A toxicity in *Daphnia magna* in terms of reproductive activity. Molecular & Cellular Toxicology 9: 149-158.

Kim J, Kim Y, Lee S, Kwak K, Chung WJ, Choi K 2011a. Determination of mRNA expression of DMRT93B, vitellogenin, and cuticle 12 in *Daphnia magna* and their biomarker potential for endocrine disruption. Ecotoxicology 20: 1741-1748.

Kim RO, Rhee JS, Won EJ, Lee KW, Kang CM, Lee YM, Lee JS 2011b. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, Brachionus sp. Aquatic Toxicology 101: 529-539.

Kim S, Ryu DY 2013. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. Journal of Applied Toxicology 33: 78-89.

Krishnaraj C, Harper SL, Yun S-I 2016. In Vivo toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult Zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Hazardous Materials 301: 480-491.

Le TH, Lim ES, Lee SK, Choi YW, Kim YH, Min J 2010. Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*. Chemosphere 79: 67-71.

Liu Y, Ding R, Pan BB, Wang L, Liu SJ, Nie XP 2019. Simvastatin affect the expression of detoxification-related genes and enzymes in *Daphnia magna* and alter its life history parameters. Ecotoxicology and Environmental Safety 182.

Liu Y, Wang L, Pan BB, Wang C, Bao S, Nie XP 2017. Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology 183: 104-113.

Pakrashi S, Tan C, Wang WX 2017. Bioaccumulation-based silver nanoparticle toxicity in *Daphnia magna* and maternal impacts. Environmental Toxicology and Chemistry 36: 3359-3366.

Sakka Y, Skjolding LM, Mackevica A, Filser J, Baun A 2016. Behavior and chronic toxicity of two differently stabilized silver nanoparticles to *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology 177: 526-535.

Schlotz N, Roulin A, Ebert D, Martin-Creuzburg D 2016. Combined effects of dietary polyunsaturated fatty acids and parasite exposure on eicosanoid-related gene expression in an invertebrate model. Comperative Biochemistry and Physiology A 201: 115-123.

Sehnal K, Hosnedlova B, Docekalova M, Stankova M, Uhlirova D, Tothova Z, Kepinska M, Milnerowicz H, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B 2019. An Assessment of the Effect of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Sage Leaves (*Salvia officinalis* L.) on Germinated Plants of Maize (*Zea mays* L.). Nanomaterials 9: 1550.

Wang L, Peng Y, Nie XP, Pan BB, Ku PJ, Bao S 2016. Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. Comperative Biochemistry and Physiology C 179: 49-56.

Zhao CM, Wang WX 2011. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 30: 885-892.

# "Tombul" fındığının (*Corylus avellana*) çiçek fenolojisi

Yaşar Akçin

Nuriye Halit Çebi Özel Eğitim Meslek Lisesi, Ordu, Türkiye

akcinyasar@gmail.com

**Özet**

Çalışma 2018-2019 yıllarında "Tombul" fındık çeşidinin çiçek fenolojik özelliklerini ortaya koymak için Ordu ilinin sahil kuşağında 40° 57ˡ58.7N 37° 55ˡ 22.7E konumunda yer alan Karapınar mahallesindeki bir üretici bahçesinde yürütülmüştür. Çalışmada erkek çiçeklerin ilk gözükmesi, püsküllerin gelişmesi, püsküldeki erkek çiçek sayısı, anter sayısı, polen sayısı, polen tüpü gelişimi, tozlanma başlangıcı, tozlanma sonu, dişi çiçek (karanfil) gelişimi, stigma oluşumu, parçalı stigma, tozlanmış karanfil, çiçek tozu kabul dönemi (reseptif) sonu, ovaryum oluşum dönemi, çotanak oluşumu başlangıcı, ilk meyve tutumu gibi özellikler gözlemlenerek her bir gelişme durumu ve dönemi makro ve mikro çekimlerle resimlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Corylus avellana*, Fındık, "Tombul", Çiçek, Püskül, Karanfil

## Flower phenology of "Tombul" hazelnut (*Corylus avellana*)

**Abstract**

The study was carried out in the coastal zone of Ordu province (40° 57ˡ58.7N 37° 55ˡ 22.7E, Karapınar district) in 2018-2019 in order to reveal the floral phenological characteristics of the "Tombul" cultivar. In the study, properties such as the first appearance of male flowers, the development of catkins, number of male flowers of catkins, number of anther, number of pollen, pollen tube development, the beginning of pollination, end of pollination, development of pistillate flower, formation of stigma, divided stigma, pollinated pistillate flower, end of receptive period, formation of ovary, beginning of formation of husks and the beginning of fruit formation were determined. Each development situation and period is illustrated with macro and micro shots.

**Keywords:** *Corylus avellana*, Hazelnut, "Tombul", Flower, Catkins, Pistillate flower.

## GİRİŞ

Tombul fındık, Fagales takımının Betulaceae familyası, *Corylus* cinsi içerisinde yer almaktadır. (Davis, 1982). *Corylus* cinsi monoik-diklin çiçek yapısına sahiptir ve tozlaşması rüzgar ile gerçekleşmektedir (Lageerstedt, 1975). "Tombul" fındıkta erkek çiçekler amentum şeklindedir. Temmuz ayının başlarında görülmeye başlayan erkek çiçeklere halk arasında "püs, püskül, kedicik" isimleri de verilmektedir . Dişi çiçekler ise karanfil adını almaktadır (Özbek, 1978; Ayfer ve ark., 1986; Davis, 1982). Fındık bitkisi çoğunlukla dünyanın ılıman iklime sahip olan bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Türkiye, Dünya'daki toplam fındık üretiminin yaklaşık % 70'ini, ihracatın ise % 80'ini gerçekleştirmektedir (Köksal, 2018). Son 5 yıllık fındık verimi ortalamasına göre Türkiye dekara verimlilikte 78 kg ile son sıralarda yer almaktadır (Anonim, 2018).

Fındık bitkisinin verimini artırmak için kültürel ve teknik uygulamaların yapılması ve istenilen verim düzeyine ulaşılması için de fenolojik gözlemlerinde takip edilmesi önemlidir. İlk dişi ve erkek çiçeklerin ortaya çıkmasından, tozlaşma, döllenme ve meyve tutumuna kadar geçen süreçte takip edilecek gözlemler, Türk fındık çeşitlerinde var olan verim düşüklüğü probleminin çözümüne yönelik fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

## MATERYAL VE METOT

Çalışma 2018-2019 yıllarında Ordu ilinde $40^0$ $57^1$58.7N $37^0$ $55^1$ 22.7E konumunda sahil kuşağında yer alan Karapınar mahallesinde bir üretici bahçesinde yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan fenolojik gözlemler Arıkan, 1963; Ayfer ve ark.,1986; Beyhan ve Odabaş, 1995; Bostan, 2008 ve Akçin, 2010'a göre yapılmıştır.

Çalışmada 'Tombul' fındığa ait incelenen toplam 16 özellik Tablo 1. de belirtilmiştir. "Tombul" fındık çeşidine ait belirlenen bu özelliklerin bir kısmı oluşum zamanları ve oluşma basamakları açısından incelenirken bazıları ise sadece makro ve mikro çekimlerle resimlenmiştir. Her bir anterdeki polen sayısı Nikon FDX-35 marka mikroskop ile Imaging Software NIS Elements Version 3.00SP5 Görüntü Analiz Programı kullanılarak sayılmıştır. 10 anter sayımının ortalaması alınmıştır.

**Tablo 1**. "Tombul" fındık çeşidine ait incelenen özellikler

| | |
|---|---|
| 1 | Erkek çiçeklerin ilk gözükmesi |
| 2 | Püsküllerin gelişmesi |
| 3 | Püsküldeki erkek çiçek sayısı |
| 4 | Her bir erkek çiçekte anter sayısı |
| 5 | Polen sayısı |
| 6 | Polen tüpü gelişimi |
| 7 | Tozlanma başlangıcı |
| 8 | Tozlanma sonu |
| 9 | Dişi çiçek (karanfil) gelişimi |
| 10 | Stigma oluşumu |
| 11 | Parçalı stigma |
| 12 | Tozlanmış karanfil |
| 13 | Çiçek tozu kabul dönemi (reseptif) sonu |
| 14 | Ovaryum oluşum dönemi |
| 15 | Çotanak oluşumu başlangıcı, |
| 16 | İlk meyve tutumu |

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Tombul fındıkta incelenen ve Tablo 1.de belirtilen özelliklerin bir kısmı hem oluşum zamanları hem de oluşma basamakları açısından incelenirken bazı özellikler ise sadece makro ve mikro çekimlerle resimlenmiştir (Şekil1-12). Özelliklerin oluşum zamanları Tablo 2.de gösterilmiştir. "Tombul" fındık ile yapılan bu çalışmada, erkek çiçekler 07.07.2018, ilk dişi çiçekler ise 26.09.2018 tarihinde görülmüştür. Erkek çiçeklerin ilk gözükme tarihinden itibaren 6-8 cm uzunluğuna gelinceye kadar yaklaşık 6 ay gerekmektedir. Ocak ayının başlarında püsküller belirli bir boyuta ulaşmışlardır. Bostan (2008) sahil kuşağında yaptığı çalışmada Tombul ve Palaz çeşitlerinde erkek çiçeklerin 15.07.1999 tarihinde gözüktüğünü belirtmiştir. Beyhan (1993) ise Palaz, Kuş ve Tombul çeşitlerinde erkek çiçeklerin Temmuzun 2. yarısından sonra ve ağustos başlarında gözüktüğünü bildirmektedir.

Yaptığımız çalışmada "Tombul" fındıkta tozlama ve tozlanma periyodu protogeni-homogam olarak belirlenmiştir. Ayfer ve ark. (1986) da yaptıkları çalışmada Türk fındık çeşitlerinde protogeni-homogam görüldüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda tozlaşma başlangıcı 23.01.2019 tarihinde gerçekleşmiştir. Püsküllerde bulunan polenlerin yaklaşık % 90'ının saçılması 'Tombul 'fındıkta tozlanma sonu olarak kabul edilmiştir. "Tombul" fındıkta tozlanma dönemi 30 gün sürmüştür. Beyhan ve Odabaş, (1995) yaptıkları çalışmada erkek çiçeklerde tozlanma başlangıcının 24.01.1991 tarihinde başladığını ve 59 gün sürdüğünü ifade etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada Çalışkan (1995) "Tombul" fındıkta erkek ve dişi çiçeklerin açım zamanının 10-20 Ocak olarak belirtmiştir. Tozlanma süresinin ise bu çeşit için 45 gün sürdüğünü bildirmiştir. Akçin (2010) Ordu ili sahil şeridinde yaptığı çalışmada "Tombul" fındık çeşidinde tozlama periyodunun 15 gün sürdüğünü bildirmiştir. Bu veriler de çiçeklenme başlangıç tarihleri ve tozlama sürelerinin iklim faktörlerine göre değişik tarihlerde gerçekleştiğini desteklemektedir.

"Tombul" çeşidinde ortalama 1-5 tane püs vardır. Her bir püste de yaklaşık olarak 168-192 adet erkek çiçek bulunmaktadır. Her bir erkek çiçekte 8 tane anter tespit edilmiştir. 1 kedicikte ortalama180 tane erkek çiçek, her çiçekte 8 tane anter, 1 anterde de ortalama 4800 polen belirlenmiştir. Bir kedicikte ortalama 6912000 (4800x180x8) tane polen bulunmaktadır. İncelenen örneklerde polen tüpü gelişimi $15C^0$ de gerçekleşmiştir.

Aygün ve Yılmaz (2018) Türk fındık çeşitlerinde polen tüpü gelişiminin genellikle 15 $C^0$ de olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda dişi çiçeklerde polen tozu kabulü 25.01.2019-19.02.2019 tarihleri arasında gerçekleşmiştir. Reseptif dönem 26 gün sürmüştür. Beyhan ve Odabaş (1995) ise yaptıkları çalışmada reseptif dönemin 80 gün sürdüğünü belirtmişlerdir. Akçin (2010) 2008-2009 yılları arasında yaptığı çalışmada "Tombul" fındıkta reseptif dönemin 60 gün olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda tozlaşmadan 1-2 hafta sonra sürgün ve tohum taslaklarının oluşacağı bölgelerde renk değişimi gözlenmiştir. "Tombul" fındıkta mart ortasına doğru (15.03.2019) ovaryum ve tohum taslaklarının gelişmesi gözlemlenmiştir. Döllenme olayı ise 15-25 Mart 2019 tarihleri arasında gerçekleşmiştir. Zuruf oluşumu mart ayının sonlarında belirginleşmiştir. Çotanak oluşumu ise nisan ayının başlarında gözlemlenmiştir.

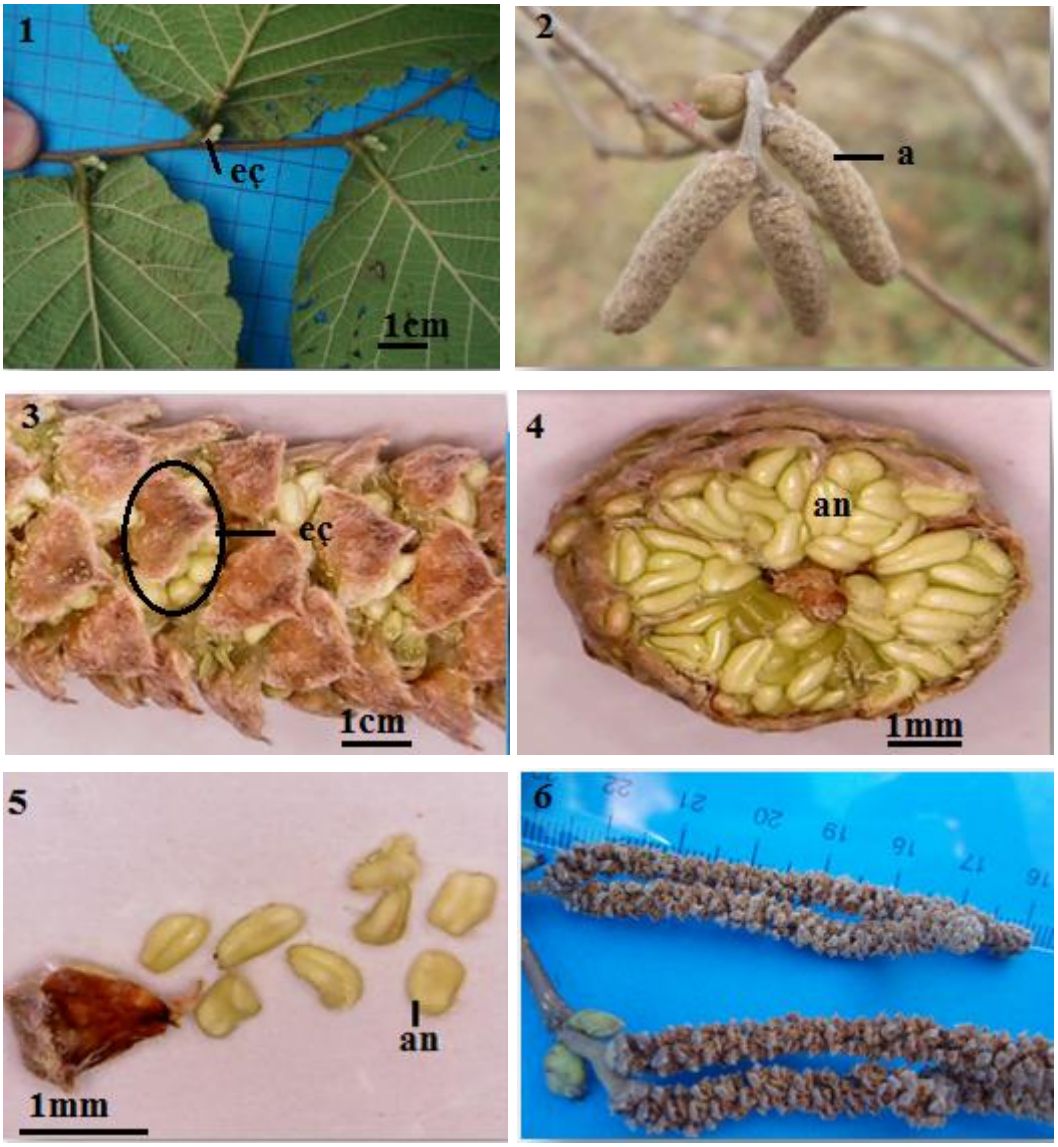
**Tablo 1**. "Tombul" fındık çeşidinde bazı fenolojik özelliklerin görünme zamanları.

| | |
|---|---|
| Erkek çiçeklerin ilk gözükmesi | 07.07.2018 |
| Püsküllerin gelişmesi | 02.01.2019 |
| Tozlanma başlangıcı | 23.01.2019 |
| Tozlanma sonu | 21.02.2019 |
| Dişi çiçek (karanfil) gelişimi | 26.09.2018 |
| Stigma oluşumu | 25.12.2018 |
| Tozlanmış karanfil | 29.01.2019 |
| Çiçek tozu kabul dönemi (reseptif) sonu | 19.02.2019 |
| Ovaryum oluşum dönemi | 15.03.2019 |
| Çotanak oluşumu başlangıcı, | 09.04.2019 |
| İlk meyve tutumu | 04.05.2019 |

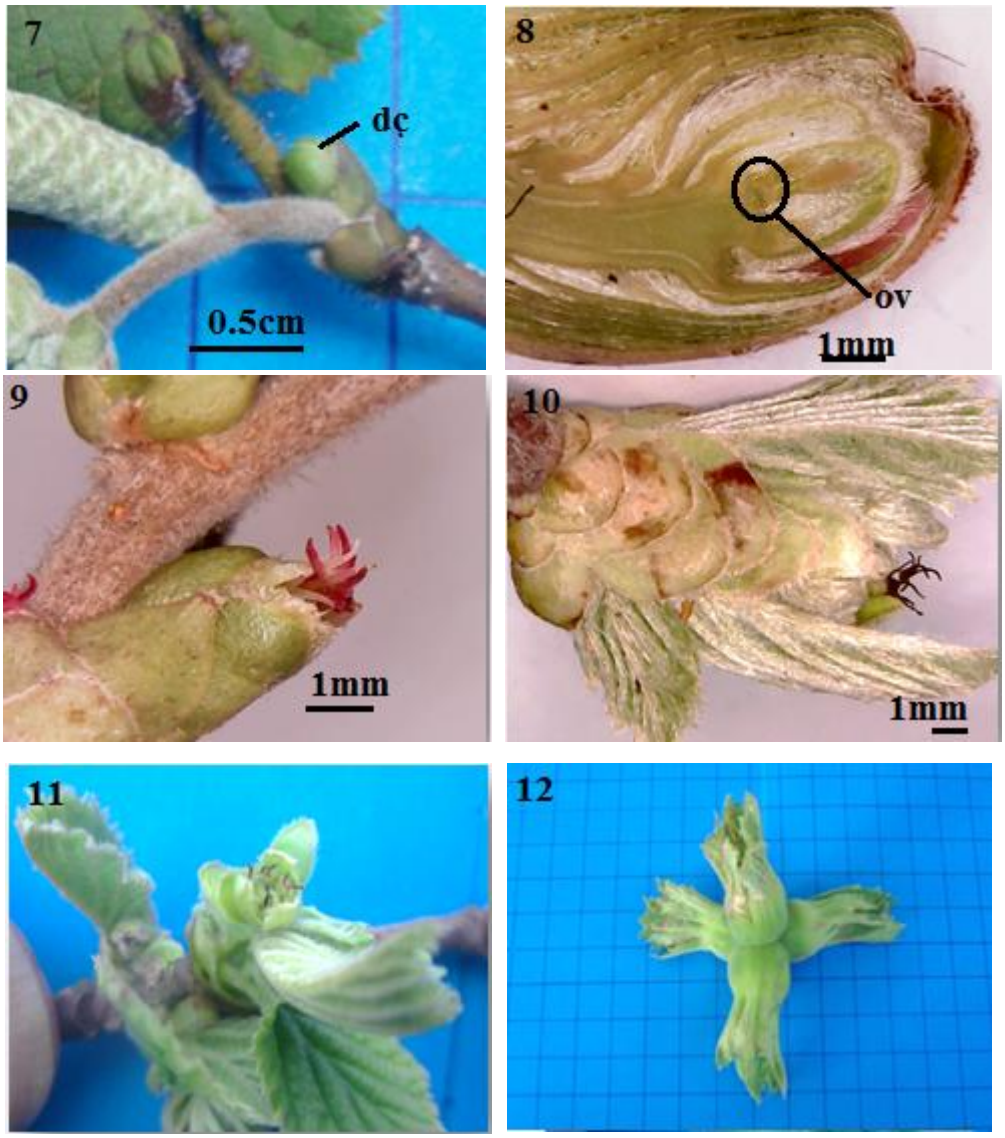
## SONUÇ

Yaptığımız çalışma ve literatür taraması sonucunda "Tombul" fındıkta çiçek açma, tozlanma ve döllenme olaylarının iklimsel şartlardan etkilendiği net bir şekilde görülmektedir. Bu yüzden fındığın fenolojik özelliklerinin takip edilmesi verim düşüklüğü probleminin çözümüne yönelik fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Türk fındık çeşitlerinde döllenme yetersizliğine ve verim düşüklüğüne sebep olan sporofitik uyuşmazlık yaygındır. Bu soruna bağlı verim düşüklüğünü en aza indirmek için tozlayıcı çeşitlerin belirlenmesi ve tozlaşma periyodunun saptanması açısından çeşitlerin dişi ve erkek çiçeklerin ortaya çıkmasından, tozlaşma, döllenme ve meyve tutumuna kadar geçen süreçte takip edilecek gözlemler, Türk fındık çeşitlerinde var olan verim düşüklüğü probleminin çözümüne yönelik fayda sağlayacağı düşünülmektedir.




**Şekil 1-6.** "Tombul" fındıkta erkek çiçek gelişimi**. 1.** Erkek çiçeklerin yeni oluşumu**. 2.** Amentum şeklindeki erkek çiçekler. **3.** Olgun erkek çiçekler**. 4.** Olgun erkek çiçeklerde anterler. **5.** Bir erkek çiçekteki anterler. **6.** Tozlanma dönemi sonu.




**Şekil 7-12.** "Tombul" fındıkta dişi çiçek gelişimi**. 7.** Dişi çiçeklerin (karanfil) yeni oluşumu**. 8.**Ovaryum gelişimi başlangıcı. **9.** Olgun dişi çiçekler**. 10.** Polen tozu kabul dönemi sonu. **11.** Çotanak oluşumu başlangıcı. **12.** 4'lü çotanak.

## KAYNAKLAR

Akçin Y 2010. Fındıkta Verim ve Verime Etki Eden Bazı Özellikler Arasındaki İlişkiler. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ordu.

Anonim 2018. Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü-Fındık raporu 2017 verisi. AB Fındık Danışma Kurulu toplantısı, 2017.

Arıkan F 1963. Fındık Ziraatının Gelişme İmkanları. Tarım Bakanlığı Mesleki Kitaplar Serisi. Ankara: Güzel Sanatlar Matbaası, 64 s.

Ayfer M, Uzun A, Baş F 1986, Türk Fındık Çeşitleri. Ankara: Karadeniz Bölgesi Fındık İhracatçılar Birliği, 95 s.

Aygün A, Yılmaz M 2018. Determination of male flower characteristics of Turkish hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. Acta horticulturae 1226: 137-140.

Beyhan N 1993. Bazı önemli fındık çeşitlerinin çiçek gelişim safhaları ve çiçek biyolojileri üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 175 s.

Beyhan N, Odabaş F 1995. Bazı Önemli Fındık Çeşitlerinde Çiçeklenme Dönemlerinin Çevresel Faktörlerle İlişkileri Üzerinde Bir Araştırma. II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildiriler Kitabı, 494-498.

Bostan SZ 2008. Phenological Traits of Important Hazelnut Cultivars in Ordu, Turkey.7th International Congress on Hazelnut.23-27 June 2008, Viterbo, Italy.

Çalışkan T 1995. Fındık Çeşit Kataloğu. Ankara: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Bitkisel Üretim Geliştirme Daire Başkanlığı, Mesleki Yayınlar Serisi, 72s.

Davis PH (Ed.) 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 7. Edinburg: Edinburgh University Press, 685-688 pp.

Köksal M 2018. Türk fındık çeşitleri. Ankara: KİB, 182 pp.

Lageerstedt HB 1975. Filberts. In: Janick J, Moore JN (eds), Advences İn Fruit Breeding.USA: Purdue Unıv. Press. West Lafayette, Ind,, pp. 456-489.

Özbek, S. 1978. Özel Meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları No:128. Ders kitabı 11. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 486 s.

# Psychobiotics

Zehra Tuğçe Toprak[1*], Pınar Şanlıbaba[1]

[1] Ankara University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Ankara, Turkey

[*]zehratugcetoprak@gmail.com

## Abstract

Probiotics play an important role in health protection. Psychobiotics described in 2013 are a group of probiotics with antidepressant or anxiolytic activity that affect the central nervous system (CNS) via neural, immune and metabolic pathways. In addition to, they act on the gastrointestinal tract. They are capable of producing and delivering neuroactive molecules which act on brain-gut axis. These molecules modulate neural signals that affect neurological and psychiatric parameters like appetite, mood, sleep and cognition. In recent years, the studies have suggested that some psychobiotics strains are efficacious in improving of the symptoms of psychiatric disorders such as anxiety and depression. Psychobiotics have impact on many types of neurodegenerative and neurodevelopmental disorders, including autism spectrum disorder, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. More systematic studies in this area are needed to understand the mechanism and efficacy of psychobiotics as an alternative treatment for this type of disorders.

**Key words:** Psychobiotics, probiotics, mental health

## INTRODUCTION

The gastrointestinal (GI) microbiota is a complex metabolic ecosystem that contains at least 1000 different species of known bacteria (Rieder et al., 2017). This microbiota is dominated by bacteria but also including archaea, protozoa, viruses, yeasts and helminth parasites (Foster et al., 2017). The colonization of the infant gut begins at birth during vaginal delivery with a maternal signature and followed by complex adult microbiota after the first age (Petra et al., 2015). The adult gut is inhabited by $10^{13}$ to $10^{14}$ microorganisms and this number is thought to be at least 10 times greater than the number of human cells (Dinan et al., 2013). The total weight of these microorganisms is 1-2 kg, similar to the weight of the human brain (Dinan et al., 2015; Foster et al., 2017).

*Firmicutes* (species such as *Lactobacillus, Clostridium, Enterococcus*) and *Bacteroidetes* (species such as *Bacteroides*) are two dominant phylotypes in the gut microbiome (Kelly et al., 2016). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Saccharomyces* are known as probiotics and they exert beneficial health effects by restoring the balance of gut microflora (Kali, 2016). These bacteria can communicate with the host through the microbiota-gut-brain axis which includes the immune, neuroendocrine and neural pathways to affect brain and behavior (Liang et al., 2015). It is known that probiotics are related to vitamin synthesis, stimulation of the immune system, metabolism of carcinogens, protection of the intestinal barrier defense system, prevention of pathogenic microbial colonization, production of short-chain fatty acids (SCFAs) for enterocyte energy and potentially lowering levels of neurotoxic components (Logan and Katzman, 2005). Probiotics are applied to treat intestinal dysbiosis associated with *Clostridium difficile* infection, traveler's diarrhea, prolonged antibiotic use and chemotherapy. Some of the probiotics, such as *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus* and *Candida* have been found to produce psychotropic effects (Kali, 2016). Dinan et al., (2013) defined the term "psychobiotics" as a novel class of probiotics that, when ingested in adequate amounts, suggest potential applications in treating psychiatric disorders. Psychobiotics may regulate proteins and neurotransmitter molecules, including serotonin, glycine, glutamate, gamma-amino butyric acid (GABA), catecholamines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which play crucial roles in controlling cognitive functions, mood, neural excitatory-inhibitory balance, learning and memory processes (Kali, 2016; Cheng et al., 2019). These probiotics contribute to basic physiological processes, including growth, the maintenance of homeostasis and digestion. In addition to this, they may have therapeutic value in the treatment of various disorders and chronic diseases, such as depression, anxiety, asthma, obesity, chronic fatigue syndrome, diabetes, hepatic encephalopathy, inflammatory bowel diseases (IBDs), irritable bowel syndrome and autism (Liang et al., 2015; Rieder et al., 2017).

In this review, we summarized the potential applications of psychobiotics to mental health disorders and some diseases.

## MENTAL HEALTH DISORDERS

Recently increasing numbers of studies have suggested that the GI microbiota is involved in the pathophysiology of stress-related diseases. Chronic stress can induce biochemical, cognitive, behavioral and gut microbiota aberrations. The conditions of under stress, the numbers of beneficial bacteria like genus *Lactobacillus* have been found to decrease but the harmful and neutral bacteria such as genus *Clostridium* and *Citrobacter rodentium* increased. The infection that is about these pathogenic bacteria increased anxiety-like behavior and caused memory dysfunction (Desbonnet et al., 2010; Liang et al., 2015).

Proposed by Logan and Katzman (2005), the application of psychobiotics as an adjuvant in major depressive disorder treatment. The main pathways of microbiota-gut-brain axis are endocrine routes, nerve routes and immune routes such that they are also included in the pathophysiology of major depression (Liang et al., 2015).

Lyte (2011) claimed that probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds and probiotic treatment may be tailored to treat psychological disorders. Some strains of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* including *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium dentium* produce GABA and serotonin (Lyte, 2011; Cheng et al., 2019). GABA is the essential inhibitory neurotransmitter in the brain regulating many physiological and psychological processes with dysfunction in the system involved in depression and anxiety. Serotonin is a metabolite of tryptophan. It has a critical role in the regulation of several physical functions implicated in mood (Dinan et al., 2013). *Lactobacillus*, such as *Lactobacillus odontolyticus* and *Lactobacillus plantarum* produce acetylcholine that is main neurotransmitter in the human brain (Roshchina, 2010; Cheng et al., 2019). *Saccharomyces, Escherichia* and *Bacillus* secrete norepinephrine; *Streptococcus, Enterococcus, Candida* and *Escherichia* secrete serotonin, while *Serratia* and *Bacillus* have the potential to secrete dopamine. All these neurotransmitters have a critical role in mental health (Fond et al., 2015).

Lower hippocampal BDNF has been associated with anxiety and depressive behavior. It is clear that BDNF level is normalizing after antidepressant treatment. The administration of *Bifidobacterium longum* NCC3001 in mice reduced anxiety and depression. The expression of BDNF in the hippocampus is upregulated by this probiotic treatment (Bercik et al., 2010). Using a strain of *Bifidobacterium infantis* 35624 in the rat maternal separation model affects neuronal systems and depression-like behaviors (Desbonnet et al., 2010). Consumption of a probiotic formulation consisting of *Bifidobacterium longum* R0175 and *Lactobacillus helveticus* R0052 reduced anxiety-like behavior in rats and alleviated psychological distress in human volunteers (Messaoudi et al., 2011). Liang et al. (2015) indicated that chronic *Lactobacillus helveticus* NS8 supplementation reduced depression, anxiety and cognitive dysfunction in the adult rats. By this way, the serotonin, BDNF and norepinephrine levels increased. The administration of *Bifidobacterium longum* 1714 by the healthy volunteers for four weeks improved memory and reduced stress (Allen et al., 2016).

## ALZHEIMER'S DISEASE (AD)

Alzheimer's disease is one of the most common, chronic neurodegenerative disorders in the elderly characterized by cognitive and memory impairments (Abraham et al., 2019; Cheng et al., 2019). Accumulation of abnormal amyloid-β peptides, which is the histopathological hallmark of AD, includes an inflammatory response in the brain and the microbiome may be linked to this accumulation (Bonfili et al., 2018; Abraham et al., 2019).

The study, is the first evaluating the beneficial effects of probiotic formulation on cognitive function, inflammation and metabolic status, biomarkers of oxidative stress in AD patients, was reported in 2016. This randomized, double-blind and controlled trial demonstrated that consumption of probiotic milk containing *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus fermentum* decreased the plasma malondialdehyde (MDA) and high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels. The insulin sensitivity, beta-cell function and insulin resistance were changed. Especially, the Mini-Mental State Examination (MMSE) score was remarkably improved in the probiotic treated group (Akbari et al., 2016). The

treatment with cow's milk fermented with *Lactobacillus fermentum* LAB9 or *L. casei* LABPC increases antioxidant levels, learning and memory behavior in mice. In addition, the levels of acetylcholinesterase (AChE), MDA and pro-inflammatory cytokines are reduced in the probiotic group compared with the control group (Musa et al., 2017). The evidence on the effects of probiotics on improvement cognitive disorders are limited (Cheng et al., 2019). The cognitive and biochemical indications in patients with severe AD were insensitive to the probiotic supplementation. By this study; it is reported that in addition to the formulation and dosage of probiotic bacteria, the severity of the disease and the duration of administration affects treatment results (Agahi et al., 2018). The administration of probiotic formulation SLAB51(*Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium longum, B. infantis, B. breve, Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, L. paracasei, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. brevis*) on transgenic AD mice significantly reduced the oxidative stress associated with AD (Bonfili et al., 2018).

## PARKINSON'S DISEASE (PD)

Parkinson's disease is a neuropsychiatric disturbance that influences up to two percent of the elderly people (Tamtaji et al., 2019). It is firstly characterized by various motor and non-motor symptoms (Jones et al., 2020). These non-motor symptoms including constipation, olfactory deficit, sleep disorders and a variety of neuropsychiatric manifestations can become important both early stages and progression of PD (Taylor et al., 2013). They may be related to disruption of the microbiome-gut-brain axis. It is indicated that motor neurons in the brain gradually begin to die and changed normal dopaminergic and cholinergic neuronal activity. Two crucial neuropathological perspective of PD are distinctive α-synuclein containing cytoplasmic inclusions known as Lewy bodies (LB) and the loss of pigmented dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNPC). Loss of dopaminergic neurons is responsible for the distinctive movement disorder and vagal nerve dysfunction. It is reported that α-synuclein which is the main protein component of LB plays a pathological role in the advancement of PD. LB and α-synuclein may appear and begin to accumulate in the gut before they appear in the brain. After ingestion of neurotropic pathogen leading to PD, this accumulation progresses through the vagus nerve to the brain. Colonic inflammation has also been reported in PD. Oxidative stress, excitotoxicity, increased inflammatory cytokines, mitochondrial dysfunction, gene mutation, increased production of free radicals, environment factors, genetic factors are linked to etiology of PD (Hill-Burns et al., 2017; Liddle, 2018; Sharma et al., 2019; Jones et al., 2020).

Intestinal microbiota is known to play a critical role in the PD pathogenesis. The alteration in GI microbiota and excessive neuroinflammation in gut of the PD patient cause non motor symptoms such as constipation. Constipation is the most common complication that reported in many PD patients. The severity of constipation increases the risk of progression of PD. It is reported that the increased risk of constipation will cause autonomic dysfunction of GI system permeability in PD. An alternative therapy based on restoring the gut microbiome to prevent or halt the progression of PD pathologies like probiotics ameliorate the symptoms of constipation (Cheng et al., 2019; Sharma et al., 2019; Srivastav et al., 2019).

Treatment with a probiotic supplement containing *Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium infantis* reduced abdominal pain and bloating in PD patients (Georgescu et al., 2016). The study, evaluated the neuroprotective effects of probiotics containing *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium animalis lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in PD models, demonstrated that butyrate level increased and neurodegeneration is partially improved (Srivastav et al., 2019). In the first report of the effects of probiotic consumption on movement and metabolic parameters in people with PD, a probiotic combination of *Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* was consumed for 12 weeks. As a result of probiotic administration, a decreased score on the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) was obtained compared to the placebo group. Probiotic intake reduced hs-CRP and MDA levels but increased glutathione (GSH) levels. In addition, consumption of probiotic decreased insulin levels compared with the placebo (Tamtaji et al., 2019).

## AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD)

Autism spectrum disorder is a neurodevelopmental disorder characterized by deficits in social communication and interactions accompanied by restricted and repetitive patterns of behavior, interests and/or activities (Critchfield et al., 2011).

Within the past decade, some studies indicate that the microbiome have an effect on neurodevelopment disorders. While the mechanisms of these effects are still not fully determined, recent evidence suggests that administration of probiotic bacteria may be a promising novel therapeutic tool to restore normal gut microbiota, reduce inflammation, restore epithelial barrier function and possibly ameliorate some behavioral manifestations associated with ASD (Shaaban et al., 2018; Tabouy et al., 2018).

The probiotic treatment of multi-strain mixture (*Bifidobacterium breve, B. longum, B. infantis, Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, L. paracasei, L. bulgaricus, L. delbrueckii* subsp. *Streptococci thermophilus and S. salivarius* subsp.) reduced the severity of abdominal symptoms and improvement in ASD after few weeks from probiotic administration begun (Grossi et al., 2016). In an open-label study in Egypt, the effects of these on GI and ASD symptoms were evaluated using 3 probiotic strains, *L. acidophilus, L. rhamnosus* and *B. longum*. After 3 months of probiotic administration, the severity of autism and GI symptoms improved, assessed using ATEC (Autism Treatment Evaluation Checklist) and 6-GSI (a modified six-item Gastrointestinal Severity Index) (Shaaban et al., 2018). Treatment of mice with *L. reuteri* resulted in reduced social behavior, especially in male mice, and a decrease in repetitive behavior in both male and female mice. Additionally, this administration affected GABA receptor gene expression and protein levels in multiple brain regions (Tabouy et al., 2018).

## INSOMNIA

Sleep deficit has negative effects on the quality of life, cognitive function and mental health (Sahoo et al., 2012). It can cause increased risk of cardiovascular disease and decreased immunity, depression, cognitive impairment (Khan and Aouad, 2017).

The sleep states are rapid eye movement (REM) sleep and non-rapid eye movement (NREM) sleep. NREM sleep occurs most of the time asleep in humans and experimental animals (Kruger and Opp, 2016).

GABA can contribute relaxation and reduce anxiety. Therefore the effect of GABA on the gut microbiota may support to improved sleep. Lactic acid bacteria, especially *Lactobacillus* spp. including *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*, are considered the main GABA producers (Yu et al., 2020).

The gut microbiota and sleep-wake homeostasis interact mutually. In addition to changes in the intestinal microflora related to irritable bowel syndrome, REM sleep increases and sleep health deteriorates (Miyazaki et al., 2014).

The study reported that heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 supplementation reduced NREM sleep during the active phase and enhanced NREM sleep during the resting phase (Miyazaki et al., 2014). Using dietary heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 attenuated chronic sleep disorders induced by psychophysiological stress in mice. It significantly restored wakefulness and increased NREM sleep during the half of the active phase during chronic sleep disorders (Higo-Yamamoto et al., 2019). The intake of fermented milk with *L. brevis* DL1-11, a strain with high GABA producing capacity, indicated decreased in anxiety behavior and exhibited a prolonged sleep time, shortened sleep latency. The levels of some SCFAs, like butyric acid, were increased in the high-dose fermented milk mice group (Yu et al., 2020).

## CONCLUSION

The number of studies investigating the effects of psychobiotics on psychiatric disorders is increasing.

There is evidence that some strains can improve CNS function, including mood, depression, anxiety and stress response. Psychobiotic treatments could be a promising approach to improve the quality of life for people with neurodegenerative and neurodevelopmental disorders.

More studies are needed in this area so that psychobiotics can be considered as an alternative treatment for neurodegenerative and neurodevelopmental disorders.

## REFERENCES

Abraham D, Feher J, Scuderi GL, Szabo D, Dobolyi A, Cservenak M, Juhasz J, Ligeti B, Pongor S, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Higuchi M, Suzuki K, Boldogh I, Radak Z 2019. Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: Role of microbiome. Experimental Gerontology, 115: 122-131.

Agahi A, Hamidi GA, Daneshvar R, Hamdieh M, Soheili M, Alinaghipour A, Esmaeili Taba SM, Salami M 2018. Does severity of Alzheimer's disease contribute to its responsiveness to modifying gut microbiota? A double blind clinical trial. Frontiers in neurology, 9: 662.

Akbari E, Asemi Z, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, Hamidi GA, Salami M 2016. Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: A randomized, double-blind and controlled trial. Frontiers in Aging Neuroscience, 8: 256.

Allen AP, Hutch W, Borre YE, Kennedy PJ, Temko A, Boylan G, Murphy E, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G 2016. *Bifidobacterium longum* 1714 as a translational psychobiotic: Modulation of stress, electrophysiology and neurocognition in healthy volunteers. Translational psychiatry, 6(11): e939-e939.

Bercik P, Verdu EF, Foster JA, Macri, J, Potter M, Huang X, Malinowski P, Jackson W, Blennerhassett P, Neufeld KA, Lu J, Khan WI, Theulaz IC, Cherbut C, Bergonzelli GE, Collins SM 2010. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. Gastroenterology, 139(6): 2102-2112.

Bonfili L, Cecarini V, Cuccioloni M, Angeletti M, Berardi S, Scarpona S, Rossi G, Eleuteri AM 2018. SLAB51 probiotic formulation activates SIRT1 pathway promoting antioxidant and neuroprotective effects in an AD mouse model. Molecular Neurobiology, 55(10): 7987-8000.

Cheng LH, Liu YW, Wu CC, Wang S, Tsai YC 2019. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. Journal of Food and Drug Analysis, 27: 632-648.

Critchfield JW, Van Hemert S, Ash M, Mulder L, Ashwood P 2011. The Potential Role of Probiotics in the Management of Childhood Autism Spectrum Disorders. Gastroenterology Research and Practice, 2011: 1-8.

Higo-Yamamoto S, Yamamoto S, Miyazaki K, Nakakita Y, Kaneda H, Takata Y, Nakamura T, Oishi K 2019. Dietary Heat-Killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 Attenuates Chronic Sleep Disorders Induced by Psychophysiological Stress in Mice. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 65(2): 164-170.

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG 2010. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. Neuroscience, 170(4): 1179-1188.

Dinan TG, Stanton C, Cryan JF 2013. Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. Biological Psychiatry, 74(10): 720-726.

Dinan TG, Stilling RM, Stanton C, Cryan JF 2015. Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. Journal of Psychiatric Research, 63: 1-9.

Fond G, Boukouaci W, Chevalier G, Regnault A, Eberl G, Hamdani N, Dickerson F, Macgregor A, Boyer L, Dargel A, Oliveira J, Tamouza R, Leboyer M 2015. The “psychomicrobiotic”: Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review. Pathologie Biologie, 63(1): 35-42.

Foster JA, Rinaman L, Cryan JF 2017. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. Neurobiology of Stress, 7: 124-136.

Georgescu D, Ancusa OE, Georgescu LA, Ionit I, Reisz D 2016. Nonmotor gastrointestinal disorders in older patients with Parkinson’s disease: Is there hope? Clinical Interventions in Aging, 11; 1601-1608.

Grossi E, Melli S, Dunca D, Terruzzi V 2016. Unexpected improvement in core autism spectrum disorder symptoms after long-term treatment with probiotics. SAGE open medical case reports, 4: 1-5.

Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, Wissemann WT, Lewis MR, Wallen ZD, Peddada SD, Factor SA, Molho E, Zabetian CP, Knight R, Payami H 2017. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. Movement Disorders, 32(5): 739-749.

Jones JD, Rahmani E, Garcia E, Jacobs JP 2020. Gastrointestinal symptoms are predictive of trajectories of cognitive functioning in de novo Parkinson's disease. Parkinsonism & Related Disorders, 72: 7-12.

Kali A 2016. Psychobiotics: An emerging probiotic in psychiatric practice. Biomedical Journal, 39(3): 223-224.

Kelly JR, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG 2016. Brain-gut-microbiota axis: Challenges for translation in psychiatry. Annals of Epidemiology, 26(5): 366-372.

Khan MS, Aouad R 2017. The effects of insomnia and sleep loss on cardiovascular disease. Sleep Medicine Clinics, 12(2): 167-177.

Krueger JM, Opp MR 2016. Sleep and Microbes. In International Review of Neurobiology, 131: 207-225. Academic Press.

Liang S, Wang T, Hu X, Luo J, Li W, Wu X, Duan Y, Jin F 2015. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. Neuroscience, 310: 561-577.

Liddle RA 2018. Parkinson's disease from the gut. Brain Research, 1693: 201-206.

Logan AC, Katzman M 2005. Major depressive disorder: Probiotics may be an adjuvant therapy. Medical Hypotheses, 64(3): 533-538.

Lyte M 2011. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. Bioessays, 33(8): 574-581.

Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejdi A, Bisson JF, Rougeot C, Pichelin M, Cazaubiel M, Cazaubiel JM 2011. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. British Journal of Nutrition, 105(5): 755-764.

Miyazaki K, Itoh N, Yamamoto S, Higo-Yamamoto S, Nakakita Y, Kaneda H, Shigyo T, Oishi K 2014. Dietary heat-killed Lactobacillus brevis SBC8803 promotes voluntary wheel-running and affects sleep rhythms in mice. Life Sciences, 111(1-2): 47-52.

Musa NH, Mani V, Lim SM, Vidyadaran S, Majeed ABA, Ramasamy K 2017. Lactobacilli-fermented cow's milk attenuated lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in vitro and in vivo. Journal of Dairy Research, 84(4): 488-495.

Petra AI, Panagiotidou S, Hatziagelaki E, Stewart JM, Conti P, Theoharides TC 2015. Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation. Clinical Therapeutics, 37(5): 984-995.

Rieder R, Wisniewski PJ, Alderman BL, Campbell SC 2017. Microbes and mental health: A review. Brain, Behavior, and Immunity, 66: 9-17.

Roshchina VV 2010. Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. In: Lyte M, Freestone PPE (eds), Microbial Endocrinology. New York: Springer, pp. 17-52.

Sahoo S (eds) 2012. Can't Sleep? Issues of Being an Insomniac. BoD–Books on Demand.

Santocchi E, Guiducci L, Fulceri F, Billeci L, Buzzigoli E, Apicella F, Calderoni S, Grossi E, Morales MA, Muratori F 2016. Gut to brain interaction in Autism Spectrum Disorders: A randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. BMC Psychiatry, 16(1): 183.

Shaaban SY, El Gendy YG, Mehanna NS, El-Senousy WM, El-Feki HS, Saad K., El-Asheer OM 2018. The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. Nutritional Neuroscience, 21(9): 676-681.

Sharma S, Awasthi A, Singh S 2019. Altered gut microbiota and intestinal permeability in Parkinson's disease: Pathological highlight to management. Neuroscience Letters, 712: 134516.

Srivastav S, Neupane S, Bhurtel S, Katila N, Maharjan S, Choi H, Hong JT, Choi DY 2019. Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. The Journal of Nutritional Biochemistry, 69: 73-86.

Tabouy L, Getselter D, Ziv O, Karpuj M, Tabouy T, Lukic I, Maayouf R, Werbner N, Ben-Amram H, Nuriel-Ohayon M, Koren O, Elliott E 2018. Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. Brain, Behavior, and Immunity, 73: 310-319.

Tamtaji OR, Taghizadeh M, Kakhaki RD, Kouchaki E, Bahmani F, Borzabadi S, Oryan S, Mafi A, Asemi Z 2019. Clinical and metabolic response to probiotic administration in people with Parkinson's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Clinical Nutrition, 38(3): 1031-1035.

Taylor JM, Main BS, Crack PJ 2013. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. Neurochemistry international, 62(5): 803-819.

Yu L, Han X, Cen S, Duan H, Feng S, Xue Y, Tian F, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W 2020. Beneficial effect of GABA-rich fermented milk on insomnia involving regulation of gut microbiota. Microbiological Research, 223: 126409.

# Ham bal ve piyasadan temin edilen bal numunelerinin invertaz enzimi açısından karşılaştırılması

Mehmet Beykaya

Iğdır Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Iğdır, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: mehmet.beykaya@igdir.edu.tr

## Özet

Farklı bileşenler içerdiğinden karmaşık bir yapıya sahip olan bal, kendine özgü enzimleri sayesinde yüksek antibakteriyel özellikler gösterir. Balın enzim içeriği, botanik kökenine, üretim bölgesine ve mevsimine göre değişiklik göstermektedir. Balda bulunan başlıca enzimler diastaz ve invertazdır. Balın kalitesini belirlemek için yaygın olarak baldaki diastaz enzim içeriği ve Hidroksimetilfurfural (HMF) değeri kullanılmaktadır. Bu çalışma diastaz enziminin ve HMF değerinin balın kalitesini belirlemede yeterli olup olmadığı sorusuna cevap aramak için gerçekleştirilmiştir. İnvertaz ve diastaz enzimi karşılaştırıldığında, invertazın diastaza oranla ısıya çok daha duyarlı olduğu görülmektedir. İnvertaz enziminin bu hassasiyeti sayesinde ısıl işlem görmüş olmasına rağmen HMF ile diastaz değerleriyle yasal limitlere göre uygun aralıklarda gözüken balların kalitesi daha anlamlı verilerle tanımlanabilir. Bu çalışmada, arıcılardan temin edilen 331 adet ham bal numunesi ile dünyada farklı mağazalardan satın alınan 51 adet piyasa balı numunesinin HMF, diastaz ve invertaz değerleri karşılaştırılmıştır. HMF ve diastaz analizleri TS 3036 metoduyla, invertaz tayini ise IHC (2009) metoduyla gerçekleştirilmiştir. Üreticiden alınan ham ballarda ortalama invertaz değeri 212,7 U/kg olduğu görülürken ısıl işlem uygulandığı bilinen piyasa ballarının ortalama invertaz değeri 66,4 U/kg olarak bulunmuştur. Yapılan analizlerin sonucunda, invertaz değerinin balın tazeliğini, saklama koşullarını ve ısıl işlem görüp görmediğini gösteren; diastaz ve HMF değerlerinden daha iyi bir belirteç olabileceği görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda, hem üreticinin üretim sürecine katkı sağlayacak olması hem de tüketiciye bilinçli tercih hakkı sunması açısından ham bal ve pastörize bal tanımlarının Türk Gıda Kodeksinde yer almasının gerektiği değerlendirilmektedir. Buna ek olarak, 1999 yılında Uluslararası Bal Komisyonu (IHC) tarafından yapılan çalışma incelendiğinde ham bal için minimum invertaz aktivitesi sınırı 10 IN = 73,4 IU / kg olarak ve doğal olarak düşük enzim aktivitesine sahip bal türleri için (narenciye balı vb.) ise 4IN = 29,4 IU / kg olarak önerildiği görülecektir. Bu çalışmadaki öneri de mevcut çalışmamızı ve sonuçtaki önerilerimizi destekleyici mahiyettedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ham bal, İnvertaz, Balda Kalite

# Comparison of raw honey from beekeepers and honey samples from the world market in terms of invertase enzyme

## Abstract

Honey shows high antibacterial properties thanks to its unique enzymes. The enzyme content of honey varies according to its botanical origin, production region and season. The main enzymes found in honey are diastase and invertase. Diastase enzyme content and Hydroxymethylfurfural (HMF) value are commonly used to determine the quality of honey. This study was carried out to answer the question of whether diastase enzyme and HMF value is enough to determine the quality of honey. When invertase and diastase enzymes are compared, it is seen that invertase is much more sensitive to heat than diastase. Thanks to the sensitivity of the invertase enzyme, heat treated honey can be identified with more meaningful data. In this study, 331 raw honey samples obtained from beekeepers and 51 market honey were compared with HMF, diastase and invertase values. HMF and diastasis analyzes were performed using the TS 3036 method and invertase determination was performed using the IHC (2009) method. While the average invertase value of the raw honey taken from the producer was 212.7 U / kg, the average invertase value of the market honey was found to be 66.4 U / kg. As a result of the analyzes, it has been seen that the invertase value may be a better indicator than diastase and HMF values. Also, it is evaluated that the definitions of raw honey and pasteurized honey should be included in the Turkish Food Codex. In addition, in the study conducted by the International Honey Commission in 1999, the minimum invertase activity limit for raw honey was proposed as 10 IN = 73.4 IU / kg and 4IN = 29.4 IU / kg for honey types with naturally low enzyme activity. The suggestion in this study is supportive of our current study and our resulting recommendations.

**Keywords:** Raw honey, Invertase, Quality of honey

## GİRİŞ

Arıcılığın dünyadaki birçok ülkede ve Türkiye'de kırsal kalkınmada önemli bir rolü vardır. Arıcılık, ortaya çıkan ürünlerin hammaddelerinin bal arıları tarafından doğadan toplanması nedeniyle doğa koşullarına son derece bağlı bir faaliyettir (Aydın ve ark., 2020). Dolayısıyla balın, botanik ve coğrafi kökene, hava durumuna ve bölgenin iklim koşullarına bağlı olan çok karmaşık bir bileşimi vardır (Escuredo ve Seijo, 2019). Bal, bitki nektarından veya bitkilerin canlı kısımlarının bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanması ve arıya özgü maddelerle birleştirilerek salgılanması sonucu oluşan ve doğal olarak tatlı olan bir üründür. Kendine özgü özellikleri nedeniyle bazı bitki taksonlarından üretilen bal, besinsel özellikleri sayesinde daha değerli hale gelir (Kamboj ve ark., 2019). Tüm bu etkiler sonucunda ortaya çıkan ve besin değeri açısından çeşitli zenginlikler içeren bal, temel kalite kriterlerine göre tanımlanır. Bu kalite kriterleri, asitlik, nem, HMF değeri, diastaz ve invertaz sayısı, polen içeriği, şeker profili ayrıca lezzet, renk ve tat gibi duyusal özelliklerden oluşur.

Bal, genellikle ısıl işlem gibi bazı işleme teknikleri uygulandıktan sonra piyasaya sürülür. HMF içeriği, diastaz ve invertaz aktivitesi, aşırı ısınma ve tazeliğin değerlendirilmesi için analiz edilen ana kalite kontrol kriterleridir (Cervantes ve ark., 2000). Ancak balda doğal olarak bulunan diastaz ve invertaz enzimi, balın stabilitesini artırmak için kullanılan ısıl işlemler nedeniyle zarar görürken, HMF değerinde de artış gözlemlenir.

HMF, gıdalara uygulanan termal işlemler sırasında şekerlerin asidik koşullar altında doğrudan dehidrasyonu sonucu Maillard reaksiyonunda bir ara madde olarak oluşan furanik bir bileşiktir (Pasias ve ark., 2017). HMF balın tazeliğinin bir göstergesidir; bu nedenle depolama süresini ve ısıl işlem görüp görmediğini değerlendirmek için kullanılır (Kamboj ve ark., 2019).

Diastaz (α-amilaz), çiçek nektarının toplanması ve olgunlaştırılması sırasında arıya bal tarafından eklenen invertaz ve glikoz oksidaz gibi baldaki baskın enzimlerden biridir. Bir birim diastaz aktivitesi, 40°C'de bir saat içinde 0,01 gram nişastayı öngörülen bitiş noktasına dönüştürecek olan α-amilaz miktarı olarak tanımlanır (Grochowalski ve ark.,2017).

İnvertaz enzimi, nektara arı tarafından katılan ve balın olgunlaşması sırasında sakkarozu, fruktoza ve glikoza parçalayan enzimdir. Ham balda doğal olarak bulunduğu için önemli bir tazelik kriteridir (Sajid ve ark., 2020).

Balda kristalizasyonu engelleyerek stabilizasyonu arttırmayı hedefleyen ısıl işlem uygulaması invertaz aktivitesinin azalması, toplam asitliğin ve HMF miktarının artması gibi bazı değişikliklere yol açar. Özellikle HMF oluşumunun minimum düzeyde tutulabilmesi için maksimum ısıtmanın 40°C'yi geçmemesi önerilmektedir (Yılmaz ve Başaran, 2019). Ticari pastörizasyon işlemi sırasında ise, bal 15-30 dakika boyunca 70-78°C sıcaklığa maruz kalır. Bu işlemde balda HMF miktarı artar ve diastaz aktivitesi azalır, ancak bu değerler yasal limitlere uygun aralıklarda kalabilir. İnvertaz enzimi, diastaz enzimine göre ısıl işlem karşısında çok daha hassas olduğu için invertaz sayısında kayda değer bir düşüş gözlemlenir. Dolayısıyla invertaz aktivitesi bala ısıl işlem uygulanıp uygulanmadığını yorumlamak açısından diastaz ve HMF değerine göre daha faydalı bir kalite kriteridir.

Yapılan literatür araştırması sonucunda, balın besin değerini kaybetmeden, ham bal olarak tüketiciye sunulmasında invertaz aktivitesinin önemli bir kalite kriteri olabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmada, arıcılardan temin edilen ham bal numuneleri ile piyasadan satın alınan bal numunelerinin HMF, diastaz ve invertaz değerleri karşılaştırılarak balın kalitesinin daha doğru bir şekilde değerlendirilmesine katkı sağlama amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Bu çalışmada analizleri yapılacak olan 331 adet ham bal numunesi yerel arıcılardan, geri kalan 51 adet piyasa balı numunesi ise dünyada farklı mağazalardan temin edilmiştir. Analizler sırasında kullanılan kimyasallar analitik kalitede olacak şekilde temin edilmiştir.

### Metot

HMF ve diastaz analizleri TS 3036 metoduna, invertaz tayini ise IHC (2009) metoduna uygun olarak gerçekleştirilmiştir. İnvertaz tayininde metotta belirtildiği gibi ilgili kimyasallar kullanılarak tampon çözeltisi,

substrat çözeltisi ve trizma bazı hazırlanmıştır. Bu çözeltiler ile tayin yönteminde belirtilen talimatlara uygun olarak hazırlanan örnekler spektrofotometrede 400 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

İnvertaz tayini sonucunda spektrofotometrede yapılan okumalarla analiz numunelerin ve boş örneklerin değerleri kaydedilmiştir. Ardından her bir numune için absorbans farkları (1) denklemine göre belirlenmiştir. Sonrasında aşağıdaki (2) formülü ile invertaz aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\Delta A = A\text{Örnek} - A\text{Boş} \quad (1)$$

$$\text{İnvertaz Aktivitesi } (U/kg) = 158.94\ x\ \Delta A \quad (2)$$

$$\text{İnvertaz Sayısı } (IN) = 21.64\ x\ \Delta A \quad (3)$$

Arıcılardan temin edilen ve piyasadan satın alınan balların HMF, diastaz ve invertaz tayini sonuçları aşağıda sırasıyla Tablo 1 ve Tablo 2 ve Şekil 1'de verilmiştir.

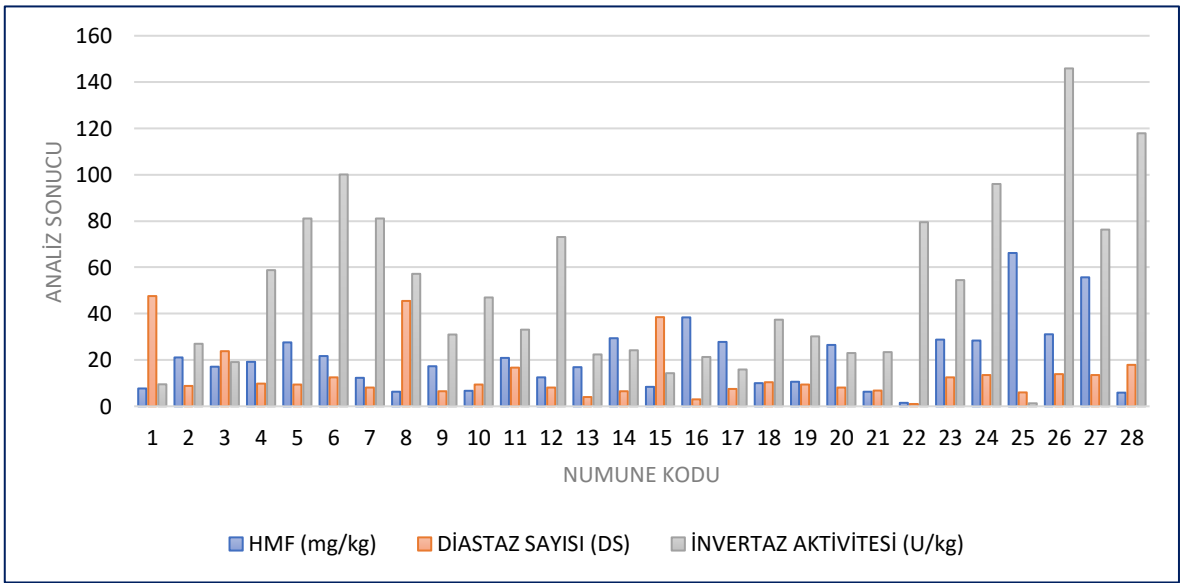
**Tablo 1.** Arıcılardan Temin Edilen Ham Bal Numunelerinin Analiz Sonuçları

| BAL CİNSİ | HMF (mg/kg) | DİASTAZ SAYISI (DS) | İNVERTAZ AKTİVİTESİ (U/kg) |
|---|---|---|---|
| Anzer Balı (n=3) | 16,1±8,9 | 14,6±4,3 | 183,4±45,2 |
| Ardahan Yayla Balı (n=5) | 4,6±2,0 | 19,6±4,8 | 191,6±70,1 |
| Ayçiçek Balı (n=19) | 6,1±4,2 | 12,4±3,2 | 143,2±44,9 |
| Bingöl Yayla Balı (n=40) | 6,5±5,8 | 11,3±1,8 | 210,7±78,9 |
| Bitlis Yayla Balı (n=11) | 5,5±2,6 | 16,8±4,3 | 255,8±100,4 |
| Çam Balı (n=65) | 3,7±2,5 | 15,3±4,6 | 229,4±72,5 |
| Diyarbakır Yayla Balı (n=10) | 5,3±3,3 | 11,4±3,7 | 184,9±41,2 |
| Geven Balı (n=5) | 6,8±2,6 | 12,2±2,2 | 143,4±28,9 |
| Hakkâri Yayla Balı (n=23) | 5,6±3,3 | 15,7±4,5 | 208,3±92,0 |
| Kars Yayla Balı (n=8) | 6,0±2,3 | 12,9±1,6 | 121,7±42,3 |
| Kestane Balı (n=35) | 7,0±7,0 | 16,6±4,0 | 214,1±84,2 |
| Konya Yayla Balı (n=12) | 7,9±5,0 | 12,0±2,9 | 297,4±89,9 |
| Lavanta Balı (n=6) | 7,3±4,7 | 14,4±2,7 | 125,1±38,4 |
| Mardin Yayla Balı (n=6) | 3,9±1,3 | 10,2±2,2 | 165,7±24,6 |
| Muş Yayla Balı (n=5) | 6,0±2,5 | 16,6±3,2 | 280,1±96,7 |
| Narenciye Balı (n=9) | 7,4±3,4 | 6,3±6,1 | 178,4±19,7 |
| Pamuk Balı (n=4) | 8,7±12,3 | 9,3±1,0 | 155,1±35,4 |
| Sivas Yayla Balı (n=8) | 9,8±5,8 | 12,2±2,6 | 220,8±15,6 |
| Şanlıurfa Yayla Balı (n=7) | 5,1±2,9 | 12,4±2,0 | 188,8±22,8 |
| Şemdinli Yayla Balı (n=17) | 10,9±2,9 | 18,1±3,1 | 259,1±30,4 |
| Tunceli Yayla Balı (n=2) | 4,3±1,5 | 20,1±6,9 | 293,3±52,5 |
| Van Yayla Balı (n=18) | 4,5±2,3 | 13,3±3,7 | 215,9±56,5 |
| Yüksekova Yayla Balı (n=13) | 10,3±4,3 | 17,7±2,8 | 254,1±59,3 |

Tablo 1'de farklı yörelerden arıcılardan toplanan ham balların analiz sonuçları gösterilmektedir. Aynı yöreden toplanan numunelerin ortalama değerleri verilmiştir. Tablo 1'de gösterilen sonuçlar incelendiğinde, üreticilerden alınan ham bal numunelerinin invertaz aktivitelerinin 121,7-297,4 U/kg aralığında değiştiği görülmektedir. Bu numuneler arasında en yüksek invertaz aktivitesine sahip olan bal Konya Yayla balı olmuştur. Ham ballar herhangi bir ısıl işleme maruz kalmadığından invertaz enzimini etkileyecek bir proses gerçekleştirilmemiş ve böylece invertaz değeri oldukça yüksek çıkmıştır.

**Tablo 2.** Piyasadan Satın Alınan Monofloral Bal Numunelerinin Analiz Sonuçları

| BAL CİNSİ | HMF (mg/kg) | DİASTAZ SAYISI (DS) | İNVERTAZ AKTİVİTESİ (U/kg) |
|---|---|---|---|
| Çam Balı (n=4) | 13,3±5,2 | 11,0±2,2 | 69,9±23,1 |
| Narenciye Balı (n=2) | 28,0±0,6 | 1,8±1,1 | 41,4±2,3 |
| Kekik Balı (n=1) | 22,3±0,0 | 8,8±0,0 | 26,9±0,0 |
| Kestane Balı (n=2) | 23,5±4,9 | 23,7±1,3 | 44,5±6,8 |
| Keçiboynuzu Balı (n=3) | 26,2±6,3 | 11,9±4,6 | 90,6±50,9 |
| Ihlamur Balı (n=2) | 10,7±8,6 | 10,5±2,0 | 65,0±4,7 |
| Lavanta Balı (n=1) | 25,3±0,0 | 12,8±0,0 | 21,9±0,0 |
| Orman Balı (n=1) | 11,5±0,0 | 16,7±0,0 | 124,0±0,0 |
| Yonca Balı (n=1) | 20,4±0,0 | 12,5±0,0 | 16,2±0,0 |
| Mango Balı (n=1) | 18,1±0,0 | 14,3±0,0 | 263,5±0,0 |
| Manuka Balı (n=5) | 33,3±24,2 | 10,2±4,4 | 66,3±6,0 |




**Şekil 1.** Piyasadan Satın Alınan Polifloral Bal Numunelerinin Analiz Sonuçları

Türk Gıda Kodeksi (TGK) Bal Tebliğine göre çiçek balı, salgı balı ve bu ikisinin karışımından oluşan ballarda diastaz enzimi sayısı minimum 8 olmalıdır. İstisnai olarak Narenciye balı vb. ballarda yani doğal olarak düşük diastaz enzim sayısına sahip olan ballarda ise minimum 3 olmalıdır. Ayrıca HMF değerleri, her biri için en fazla 40 mg/kg olmalıdır (www.mevzuat.gov.tr, 2012). İnvertaz aktivitesi için bir sınırlama bulunmamaktadır.

Piyasadan temin edilen monofloral bal numunelerinin analiz sonuçları Tablo 2'de incelendiğinde, tüm balların HMF analiz sonuçlarının 40 mg/kg altında olduğu ve yalnızca narenciye ballarının diastaz sayısının limit altında kaldığı görülmektedir. Buna rağmen birkaç bal cinsi dışındaki numunelerin invertaz aktiviteleri ham balların invertaz aktivitelerine göre oldukça düşüktür. Bu nedenle ballara az da olsa bir ısıl işlem uygulanmış olduğu söylenebilir.

Piyasadan temin edilen 28 adet polifloral bal numunesi arasında HMF ve diastaz değerleri yasal limitlere uyduğu halde invertaz aktivitesi düşük olan 13 adet numune olduğu görülmektedir. Bu sayı, analiz edilen polifloral piyasa ballarının %46,4'ünün ısıl işleme tabi tutulduğunu göstermekte ve bu işlemin sonucunda balın besin değerini önemli ölçüde kaybetmiş olduğu değerlendirilmektedir.

Piyasadan temin edilen balların %17,9'unun HMF değeri uygun olduğu halde diastaz ve invertaz enzim sayıları düşük değerlerde çıkmıştır. Ayrıca, numunelerin %5,9'unun ise yapılan tüm analizler bakımından tüketici kullanımına uygun olmayan değerlere sahiptir. Bunlardan iki tanesi monofloral ballar sınıfında yer alan Manuka balıdır.

Elde edilen analiz sonuçlarına göre üreticilerden alınan ham ballar, piyasadan temin edilen polifloral ve monofloral balların ortalama değerleri Tablo 3'te karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Ortalama Analiz Sonuçları

| BALIN CİNSİ | HMF (mg/kg) | DİASTAZ SAYISI (DS) | İNVERTAZ (U/kg) |
|---|---|---|---|
| Üreticilerden alınan ham ballar | 6,9±2,8 | 14,0±3,4 | 212,7±51,3 |
| Piyasadan alınan monofloral ballar | 22,6±13,6 | 10,6±4,1 | 69,4±53,1 |
| Piyasadan alınan polifloral ballar | 20,8±14,9 | 13,5±11,7 | 50,1±36,2 |

Tablo 3'te görüldüğü üzere, üreticiden alınan ham balların ortalama invertaz değeri 212,7 U/kg olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra, piyasadan alınan monofloral balların ortalama invertaz değeri 50,1 U/kg iken polifloral balların ortalama invertaz değeri 69,4 U/kg olarak hesaplanmıştır. Yapılan analizler ve elde edilen sonuçlar sadece HMF ve diastaz enzim sayısına bakılarak balın kalitesi hakkında yorum yapmanın her zaman doğru olmayacağını göstermektedir.

Bu çalışma sonunda elde edilen verilere dayanarak, hem üreticinin üretim sürecine katkı sağlayacak olması hem de tüketiciye bilinçli tercih hakkı sunması bakımından invertaz sayısı limitlerinin Türk Gıda Kodeksinde yer alması gerektiği değerlendirilmektedir. Buna ek olarak, 1999 yılında Uluslararası Bal Komisyonu tarafından yapılan çalışma incelendiğinde ham bal için minimum invertaz aktivitesi sınırı 10 IN = 73,4 IU / kg olarak ve doğal olarak düşük enzim aktivitesine sahip bal türleri için (narenciye balı vb.) ise 4IN = 29,4 IU / kg olarak önerildiği görülecektir (Bogdanov ve ark., 1999).

## SONUÇ

Balın besin değeri, zaman içinde yapılan birçok çalışmada tarif edilen basit şekerler ve tüm maddelerin (vitaminler, enzimler, mineraller, serbest amino asitler, fenolik ve uçucu organik bileşikler) kimyasal bileşiminden kaynaklanmaktadır (Mădaş ve ark., 2019). Yüksek besin değeri (330 kcal/100g) ve tüketim sonrasında karbonhidratların hızlı emilimi özellikleri nedeniyle en önemli biyo-ürünlerden biridir. Ayrıca bal antibakteriyel özelliklere sahip bir tıbbi gıda olarak kabul edilir. Balın kalitesi, arıların nektarı topladıkları çiçek türüne, bitkilerin yetiştiği iklim koşullarına ve balın işlenmesi ve saklanması koşullarına bağlıdır. Ancak, bal antibiyotikler, böcek ilaçları ve ağır metallerle kirlenme olasılığına sahiptir. Bu gibi nedenlerle, balın kalite parametrelerini izlemek tüketicinin sağlığı için büyük önem taşımaktadır (Abdulkhaliq ve Swaileh, 2017).

Bu çalışmada, HMF, diastaz sayısı ve invertaz aktivitesi olmak üzere balın üç temel kalite kriteri incelenmiştir. Balın tazeliğinin belirlenmesi ve ısıl işleme maruz kalıp kalmadığını belirlemek için yaygın olarak kullanılan HMF ve Diastaz sayısının, konu ile ilgili her zaman doğru veriler sunmadığı görülmüştür. Balın yapısında doğal olarak bulunan invertaz enzimi, diğer iki parametreye oranla ısıya daha duyarlı olduğundan bala uygulanan ısıl işlemler için doğal bir indikatör görevi görmektedir

Sonuç olarak, invertaz aktivitesinin balın ısıl işlem görüp görmediğini gösteren; diastaz ve HMF değerlerinden daha iyi bir belirteç olabileceği değerlendirilmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin yapılan literatür araştırmalarıyla uyumlu olması çalışmamızı ve sonuçtaki önerilerimizi destekleyici mahiyettedir.

**KAYNAKLAR**

Abdulkhaliq, A., Swaileh, K. M 2017. Physico-chemical properties of multi-floral honey from the West Bank, Palestine. *International Journal of Food Properties*, *20*(2), 447–454. https://0-doi-org.divit.library.itu.edu.tr/10.1080/10942912.2016.1166128

Aydin, B., Aktürk, D., & Arsoy, D 2020. Economic and efficiency analysis of beekeeping activity in Turkey: Case of Çanakkale province. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *67*(1), 23–32. https://doi.org/10.33988/auvfd.571371

Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Oddo, L. P., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Morlot, M., Lhéritier, J., Borneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., … Vit, P 1999. Honey quality and international regulatory standards: Review by the international honey commission. *Bee World*, *80*(2), 61–69. https://doi.org/10.1080/0005772x.1999.11099428

Cervantes, M. A. R., Novelo, S. A. G., & Sauri Duch, E 2000. Effect of the temporary thermıc treatment of honey on varıatıon of the qualıty of the same durıng storage. In *Apiacta* (Vol. 4). https://www.researchgate.net/profile/Enrique_Sauri/publication/267716842_Effect_of_temporary_thermic_treatment_of_honey_on_variation_of_quality_of_the_same_during_storage/links/5563373308ae9963a11cea08/Effect-of-temporary-thermic-treatment-of-honey-on-variation-of-quality-of-the-same-during-storage.pdf

Escuredo, O., & Seijo, M. C 2019. Honey: Chemical Composition, Stability and Authenticity. *Foods*, *8*(11), 577. https://doi.org/10.3390/foods8110577

Kamboj, R., Sandhu, R. S., Kaler, R. S. S., Bera, M. B., & Nanda, V 2019. Optimization of process parameters on hydroxymethylfurfural content, diastase and invertase activity of coriander honey. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(7), 3205–3214. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03774-x

Kuc, J., Grochowalski, A., & Kostina, M 2017. Determination of the Diastase Activity in Honeys. *Technical Transactions*, *8*, 29–35. https://0-doi-org.divit.library.itu.edu.tr/10.4467/2353737XCT.17.126.6877

Mădaş, N. M., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Bonta, V., Bobiş, O., Fauconnier, M.-L., Francis, F., Haubruge, E., & Nguyen, K. B 2019. Volatile Profile and Physico-Chemical Analysis of Acacia Honey for Geographical Origin and Nutritional Value Determination. *Foods*, *8*(10), 445. https://doi.org/10.3390/foods8100445

*Mevzuat bilgi sistemi, Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü*. 2012. www.mevzuat.gov.tr, (13.04. 2020)

Pasias, I. N., Kiriakou, I. K., Proestos, C 2017. HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. *Food Chemistry*, *229*, 425–431. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.084

Sajid, M., Yamin, M., Asad, F., Yaqub, S., Ahmad, S., Mubarik, M. A. M. S., Ahmad, B., Ahmad, W., & Qamer, S 2020. Comparative study of physio-chemical analysis of fresh and branded honeys from Pakistan. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(1), 173–176. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.014

Yılmaz, T., & Başaran, A 2019. International Journal of Energy Applications and Technologies Induction assisted pasteurization of honey ARTICLE INFO ABSTRACT. *International Journal of Energy Applications and Technologies*, *6*(2), 39–43. https://doi.org/10.31593/ijeat.467186

# Akıllı tarım uygulamalarının konvansiyonel tarım uygulamalarına göre çevre kirliliği açısından üstünlükleri

Hüseyin Tayyar Güldal[1*], Ahmet Özçelik[1]

[1]Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Ekonomisi Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: htguldal@ankara.edu.tr

**Özet**

Tarımsal faaliyetlerde kullanılan girdilerden kimyasal gübre ve tarımsal ilaçlarının tüketiminin artması, tarımsal girdilerin maliyetlere ve çevreye olan etkilerinin tartışılmasındaki en önemli nedenlerden biridir. Teknolojinin tarım sektörüne entegresiyle birlikte ortaya çıkan Akıllı Tarım (Tarım 4.0) uygulamalarının ana amaçlarından biri de tarımsal girdilerin optimal düzeyde kullanımını sağlayarak, karlılığı artırmak ve çevre kirliliğini azaltmaktır. Bu çalışmada, Aydın ili Koçarlı ilçesinde faaliyetlerini sürdüren Vodafone Akıllı Köy İşletmesi ile çevre köylerde üretim faaliyetlerine devam eden 10 adet konvansiyonel tarım işletmesinin, domates yetiştiriciliğinde kullandıkları kimyasal gübre ve ilaç miktarları değerlendirilmiştir. Domates üretiminde kullanılan gübrelerin bitki besin elementi bakımından farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Değerlendirme sonucunda, konvansiyonel tarım işletmelerinde dekara kullanılan bitki besin elementleri sırasıyla 38,67 kg N, 31,77 kg P ve 8,76 kg S olurken, akıllı tarım işletmesinde dekara kullanılan bitki besin elementleri sırasıyla 13,02 kg N, 16,86 kg P, 11,86 kg K, 0,002 kg Cu, 0,25 kg Zn ve 0,13 Mn'dir. Ayrıca konvansiyonel tarım işletmelerinde ortalama 0,23 lt/da insektisit ilacı kullanılırken, akıllı tarım işletmesinde 0,14 lt/da insektisit ilacı kullanıldığı saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Tarım 4.0, Akıllı Tarım, Kimyasal Gübre, Tarım İlacı, Çevre

# The superiority of smart farming according to conventional farming in terms of environmental pollution

**Abstract**

Increasing the consumption of chemical fertilizers and pesticides used in agricultural activities is one of the most important reasons for discussing the effects of agricultural inputs on costs and the environment. One of the main aims of the Smart Farming (Agriculture 4.0), which emerged with the integration of technology into the agricultural sector, is to increase the profitability and reduce environmental pollution by ensuring the optimal use of agricultural inputs. In this study, the amount of chemical fertilizers and pesticides in tomato production were evaluated, used by the Vodafone Smart Village Enterprise and 10 conventional farms in the district of Koçarlı, Aydın. It has been determined that plant nutrients usage in tomato production was different. As a result of the study, the plant nutrients used per decare in conventional farming were 38.67 kg N, 31.77 kg P and 8.76 kg S, while the plant nutrients used per decare in smart farming were 13.02 kg N, 16.86 kg P, 11.86 kg K, 0.002 kg Cu, 0.25 kg Zn and 0.13 Mn. In addition, insecticide usage in conventional farming an average of 0.23 lt / da, however, it was 0.14 lt / da in smart farming.

**Keywords:** Agriculture 4.0, Smart Farming, Chemical Fertilizer, Pesticide, Environment

## GİRİŞ

Tarım toprakları, bitki besin maddelerinin bitkiler tarafından alınması, yıkanması ve erozyona uğraması sonucu zamanla fakirleşmektedir. Bu nedenle; tarımsal üretimin en önemli kaynağı olan toprak; gübreleme, zararlılarla mücadele, işleme, sulama gibi tarımsal işlemler ile verimli hale getirilmeye çalışılmaktadır. Toprağın verimliliğini sürdürebilmesinde bitkilerce kaldırılan besin maddelerinin toprağa takviye edilmesi yani gübrelenmesi önemli konulardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Kimyasal gübreler bu nedenle yıllardır önceliğini korumaktadır (Sönmez ve ark., 2008). Dünyada ilk olarak 1840 yılında üretilen kimyasal gübrelerin kullanımı, Türkiye'de, Avrupa ve Amerika'ya göre oldukça geç başlamıştır (Gezgin, 2015, Kacar ve Katkat, 2007).

Artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için verim artıcı etmenlerin başında gelen kimyasal gübrelerin, özellikle II. Dünya savaşından sonra kullanımı artmıştır. Özellikle azotlu (N), fosforlu ($P_2O_5$) ve potasyumlu (K) gübrelerin tarımsal faaliyetlerde çok kullanıldığı ve kullanım miktarlarının giderek arttığı bilinmektedir. Bitki besin maddesi bakımından incelendiğinde, dünyada 2005 yılında azot kullanımı yaklaşık 91 milyon ton iken bu rakam 2010 yılında 100 milyon tona ve 2017 yılında 109 milyon tona yükselmiştir. 2005-2017 yılları arasında fosfor kullanımı %15 artarken (39 milyon tondan 45 milyon tona), potasyum kullanımı ise aynı dönemde %36 artmıştır (28 milyon tondan 38 milyon tona). Dünyada, tarımsal faaliyetlerde kullanılan bitki besin maddesindeki artışa paralel olarak Türkiye'de ki artış da dikkat çekmektedir. 1990 yılında azot kullanımı yaklaşık 1,2 milyon ton iken, 2016 yılında 1,9 milyon ton ile en yüksek seviyeye çıkmış, 2018 yılında ise 1,5 milyon ton olarak tespit edilmiştir. Fosfor kullanımı ise 1990 yılında 273 bin ton iken 2016 yılında 346 bin ton ile en yüksek seviyeye çıkmış, 2018 yılında ise 227 bin tona gerilemiştir. Bununla birlikte, 1990-2018 yılların arasında potasyum kullanımı %82 artarak, 2018 yılında 96 bin ton olarak belirlenmiştir (FAO, 2020).

Tarım ilacı, ürünlerde istenmeyen organizmaları yok etmede kullanılan sentetik organik bileşikler olarak tanımlanmakta olup; bitki koruma amacıyla kullanılan her türlü ilaç, preparatlar ve bunların imalinde kullanılan maddeleri kapsamaktadır (Altıkat ve ark., 2009). 1960'lı yıllarda kullanımı yaygınlaşan tarım ilaçlarının, dünyada yıllık kullanım miktarı 1990 yılında 2,3 milyon ton iken, 2017 yılında %78 artarak 4,1 milyon tona ulaşmıştır. Türkiye'de ise yıllık ortalama tarım ilacı kullanımı dünya ortalamasının gerisinde olsa da kullanım miktarının yıllar içerisinde arttığı göze çarpmaktadır. 1990 yılında yaklaşık 30 bin ton olan tarım ilacı kullanımı, 2017 yılında 54 bin tona yükselmiştir (TUİK, 2020).

Dünyada yoğun girdili tarımsal uygulamaların önem kazanmasıyla birlikte konvansiyonel tarım olarak adlandırılan üretim şeklinin yaygınlaşması hızlanmıştır. Tarımda yoğun girdi kullanımına dayanan hızlı değişim, konvansiyonel tarımdan kaynaklanan önemli çevresel maliyetlerin de ortaya çıkmasına neden olmuştur (Eryılmaz ve Kılıç, 2018). Özellikle 1980'li yıllardan sonra yoğun girdi kullanımının doğal kaynaklar ve insan sağlığı üzerindeki doğrudan ve dolaylı olumsuz etkileri, gelişmiş ülkelerden başlayarak bütün dünyada önemli kalkınma ve çevre sorunu olarak ortaya çıkmıştır (Tanrıvermiş, 2000). Entansif tarımın yoğun olduğu bölgelerde inorganik nitrat kirliliği, pestisit kirliliği ve tuzluluk problemleri tarımın çevreye verdiği olumsuz etkiler olarak sıralanabilir (Karaer ve Gürlük, 2011). Çevre ve Şehircilik Bakanlığı tarafından 2019 yılında yayınlanan rapora göre, tarımsal girdi kullanımının çevreye olan etkileri dikkat çekicidir. Raporda, Türkiye'de toprak kirliliğine neden olan etmenler içerisinde aşırı gübre kullanımının oranı 2012 yılında %6 iken bu oran 2017 yılında %9'a yükselmiştir. Bununla birlikte, Türkiye'de yeraltı sularının kirlenmesine yol açan etmenler içerisinde zirai ilaç ve gübre kullanımının oranı çok yüksek olup, bu oranın ilerleyen yıllarda arttığı belirlenmiştir (2012 yılı %81; 2017 yılı %89). Aynı raporda, il ve ilçe merkezlerinde atıksuların yol açtığı kirlenmenin nedenleri araştırılmış, ilçe olarak toplam 646 adet yerleşim biriminin %56'sında zirai ilaç ve kimyasal gübre kullanımının kirlenme nedenleri arasında olduğu belirtilmiştir (Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, 2019).

Tarımsal faaliyetlerde sürdürülebilirliğin sağlanması için tarımın çevre üzerindeki etkilerinin incelenmesi önem taşımaktadır. Dünya literatüründe, tarımın çevreye olan etkilerinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır (Bouraoui ve Grizzetti, 2014; Lu ve ark., 2015; Parris 2011; Zalidis ve ark., 2002). Türkiye'de de, tarım-çevre ilişkisinin sonuçlarını ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Demircan ve Yılmaz, 2005; Karaman, 2006; Parlakay ve ark., 2015; Peker, 2012; Sönmez ve ark., 2008). İncelenen çalışmalarda, tarımsal faaliyetlerde kimyasal gübre ve tarım ilacının yoğun olarak kullanıldığı, dengeli girdi kullanımının, tarımda sürdürülebilirlik açısından önemli olduğu vurgulanmıştır. Bu bağlamda, son yıllarda sanayi sektöründe gerçekleşen dijital dönüşümün tarım sektörüne entegresi ile ortaya çıkan Akıllı Tarım (Tarım 4.0) uygulamalarının amaçlarından biri de geliştirilmiş bilgi ve kontrol sistemlerinin kullanımıyla kaynak israfının önüne geçmek, ürünün brüt getirisini artırmak ve üretimden kaynaklanan çevresel kirliliği en aza indirmektir.

Akıllı Tarım Uygulamaları, 1990'lı yıllarda dünya tarımında uygulanmaya başlanan "Hassas Tarım" uygulamalarının devam olarak nitelendirilmekte olup, özellikle 2010 yılından sonra dünya tarımında uygulama alanları artmıştır. Dünya literatüründeki birçok çalışmada, tarım sektöründeki teknolojik uygulamaların kimyasal girdi ve tarım ilacı kullanımlarını azalttığı ortaya konulmuştur (Balsari ve Tamagnone, 1997; Ehlert

ve ark., 2004; Felton ve ark., 1991; Karimzadeh ve ark., 2011; Stafford ve Miller, 1993; Williams ve ark., 2000). Entansif tarımın yoğun olarak yapıldığı Türkiye'de ise tarımda teknolojik dönüşüm hızı, dünya tarımının gerisindedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar da sınırlı sayıda (Özgüven ve Türker, 2010) kalmakla birlikte, son yıllarda özel sektör, TÜBİTAK, TAGEM ve benzer kamu kuruluşlarının ortak proje ve araştırmaları da sürmektedir. Özel sektör araştırmalarından bir tanesi Vodafone ve Tabit firmalarının ortaklaşa olarak yürüttüğü "Akıllı Köy" projesidir.

Bu çalışmada da, Aydın İli, Koçarlı ilçesi, Kasaplar köyünde faaliyetlerini sürdüren Akıllı Köy'de, uygulamalar sonucunda kullanılan girdi miktarları ile çevre köylerde faaliyetlerini sürdüren konvansiyonel tarım işletmelerinin girdi kullanım miktarları değerlendirilmiştir.

## MATERYAL ve METOT

Araştırmada kullanılan birincil verileri, bölgede konvansiyonel tarım yapan işletmelerden ve akıllı tarım uygulamalarını gerçekleştiren Vodafone Akıllı Köy'den anket yapılarak elde edilen veriler oluşturmaktadır. Örneğe giren işletmelere gidilerek, işletmecilerle görüşme yapılmak suretiyle anket formları doldurulmuştur.

Araştırma bölgesinde akıllı tarım uygulaması yapan işletme olarak Aydin ili, Koçarlı ilçesi, Kasaplar köyünde ki Vodafone Akıllı Köy ele alınmıştır. Bu köyde 298 dekar arazide hem bitkisel hem de hayvansal üretim gerçekleştirilmektedir. 98 dekar arazide yetiştirilen bitkisel ürünler her yıl farklılaşmakla birlikte, 2017-2018 sezonunda domates, biber, patlıcan, kavun, karpuz, marul, brokoli, ıspanak ve lahanadır. Bu çalışmada domates yetiştiriciliğinde girdi kullanımındaki farklılıklar incelenmiştir. Akıllı tarım uygulamalarının, Aydın ili Koçarlı ilçesi Kasaplar köyünde yapılmasından dolayı, araştırma kapsamında belirlenen 10 konvansiyonel tarım işletmesi, Kasaplar köyü ve civar köylerdeki domates yetiştiren tarım işletmelerinden seçilmiştir. Burada amaç, iklim ve toprak yapısı bakımından benzer işletmeleri araştırmaya dahil ederek, araştırmanın asıl amacı olan akıllı tarım uygulamaları ile konvansiyonel tarım uygulamalarının doğru ve etkin bir karşılaştırmasını yapabilmektir.

## BULGULAR

Araştırma kapsamında incelenen konvansiyonel tarım yapan üreticilerin %40,00'ı 15-49 yaş aralığında iken %60,00'ının 50 yaş ve üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte üreticilerin %50,00'ı ilkokul mezunu olup ilköğretim mezunu olanların oranı %20,00 ve lise mezunu olanların oranı ise %30,00 olarak tespit edilmiştir.

Akıllı tarım yapılan işletmede domates ekim alanının 12,2 dekar, konvansiyonel tarım işletmelerinin ortalama domates ekim alanının ise 32,8 dekar olduğu saptanmıştır.

Bitkiler optimal bir şekilde büyüme ve gelişme gösterebilmeleri için en az 17 bitki besin maddesine ya da elemente ihtiyaç duymaktadır. Bu elementlerden üç tanesi hidrojen, karbon ve oksijendir (Fageria, 2016). Bitkiler bu elementleri çoğunlukla havadan ve sudan almakta iken diğer zorunlu 14 elementi topraktan almaktadırlar. Araştırma kapsamında incelenen konvansiyonel tarım işletmelerinin, domates yetiştiriciliğinde bitki besin elementi olarak azot, fosfor ve kükürt kullandıkları belirlenirken, akıllı tarım işletmesinde azot, fosfor, potasyum, bakır, çinko ve mangan elementlerini kullandıkları tespit edilmiştir. Bununla birlikte dekara kullanılan bitki besin elementlerinin, miktar bakımından da farklılıklar gösterdiği dikkat çekmektedir.

Türkiye'de ki tarım topraklarının azot bakımından fakir olduğu bilinmektedir. Makro besin elementleri içerisinde yer alan azot, su ile birlikte kıtlığı en fazla çekilen besin elementidir. Azot, bitkide gerçekleşen birçok fizyolojik ve biyokimyasal olayda çok önemli rol oynar. Azot noksanlığında bitkilerde büyüme oranı düşerken, özellikle vejetatif gelişimlerini olumsuz etkiler. Azot fazlalığı ise bitkinin vejetatif gelişme periyodunu uzatır, çiçeklenmeyi geciktirir ve şeker sentezini azaltır, meyvelerde geç olgunlaşmaya neden olur (Bolat ve Kara, 2017). İncelenen işletmelerde, konvansiyonel tarım işletmeleri dekara 38,67 kg azot kullanırken, akıllı tarım işletmesinde bu rakam 13,02 kg/da'dır.

**Tablo 1.** İncelenen işletmelerde kullanılan bitki besin elementleri miktarı* (kg/da)

| Bitki Besin Elementleri | Konvansiyonel Tarım İşletmeleri | Akıllı Tarım İşletmesi |
|---|---|---|
| Azot | 38,67 | 13,02 |
| Fosfor | 31,77 | 16,86 |
| Potasyum | - | 11,86 |
| Kükürt | 8,76 | |
| Bakır | - | 0,002 |
| Çinko | - | 0,25 |
| Mangan | - | 0,13 |

*Hesaplamalar etkin bitki besin maddesi üzerinden yapılmıştır.

Bitkilerin olgunlaşmasını hızlandırıcı etkisi olan fosfor elementi, fazla kullanılması durumunda çinko ve demir gibi mikro besin elementlerinin noksanlığına yol açabilir (Aktaş ve Ateş, 2005). İncelenen işletmelerde fosfor kullanımı konvansiyonel tarım yapan işletmelerde 31,77 kg/da iken akıllı tarım işletmesinde 16,86 kg/da, konvansiyonel tarım işletmesinde 8,76 kg/da kükürt kullanılırken akıllı tarım işletmesinde 11,86 kg /da potasyum kullanıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca akıllı tarım işletmesinin, konvansiyonel tarım işletmelerinden farklı olarak bakır (0,002 kg/da), çinko (0,25 kg/da) ve Mangan (0,13 kg/da) bitki besin elementlerini de kullandığı belirlenmiştir (Tablo 1.).

**Tablo 2.** İncelenen işletmelerde kullanılan tarım ilacı miktarı (lt/da)

| Tarım İlacı | Konvansiyonel Tarım İşletmeleri | Akıllı Tarım İşletmesi |
|---|---|---|
| İnsektisit | 0,23 | 0,14 |

Hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı farklı zirai mücadele yöntemleri arasında, %95'in üzerinde bir paya sahip olan kimyasal mücadele bugün de geçerliliğini korumaktadır. Ancak, pestisitlerin kullanımı insan sağlığı ve çevreye olumsuz etkileri gibi birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada pestisitin kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Araştırma kapsamında incelenen işletmelerde kullanılan tarım ilacı miktarları Tablo 2'de belirtilmiştir. Konvansiyonel tarım işletmelerinde kullanılan insektisit ilacı 0,23 lt/da iken akıllı tarım işletmesinde bu rakam 0,14 lt/da'dır.

Kimyasal gübre ve tarımsal mücadele ilacının birim alana kullanımları akıllı tarımda, konvansiyonel tarıma göre daha düşük seviyede olup, bu durum hem ürün maliyetlerini düşürmesi hem de doğal kaynakların kimyasallar yoluyla kirlenmelerini azaltması açısından önemlidir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Tarımsal faaliyetlerde kullanılan kimyasal gübre ve tarım ilaçlarının tüketimlerinin her yıl artan oranda yükselmesi, tarımsal kaynaklı çevre kirliliği konusunu daha da önemli hale getirmektedir. Üreticilerin bu girdilerden yoksun bir üretim faaliyeti düşünemeyeceği dikkate alındığında, kimyasal girdilerin kontrollü kullanılmasının önemi daha da artmaktadır.

Araştırma sonuçlarına göre akıllı tarım uygulamasının, konvansiyonel tarım uygulamalarına oranla dekara daha az miktarda bitki besin elementi ve tarım ilacı kullandıkları tespit edilmiştir. Bu bağlamda, tarım sektöründe yaşanan teknolojik dönüşümün yaygınlaştırılmasının, tarımsal kaynaklı çevre kirliliğini azaltmada etkili bir rol oynayacağını belirtmek mümkündür. Akıllı tarım uygulamalarının yaygınlaştırılması için öncelikli olarak, Türkiye tarımındaki işletmelerin mevcut durumunu ortaya koymak, bu işletmelerin akıllı tarım uygulamalarını gerçekleştirebilme olanaklarını tartışmak önemlidir.

Akıllı tarım uygulamaları, Türkiye tarımı için yeni ve maliyetli uygulamalardır. Akıllı tarım uygulamaları ile ilgili, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından halihazırda verilen bir destek bulunmamaktadır. Dolayısıyla, konvansiyonel tarım işletmelerinin akıllı tarım uygulamalarına entegresi aşamasında sağlanacak desteklerin,

üreticinin bu uygulamalara olan ilgisini artırabilecek miktarda olması önemlidir. Bununla birlikte konvansiyonel tarım yapan üreticilere, akıllı tarım uygulamaları hakkında bilgilendirme ve eğitim faaliyetlerinin yaygınlaştırılması, konuya olan ilgilerinin artması bakımından gereklidir. Üreticilerin örgütlenerek bu yeni teknolojilerden yararlanabilmeleri de değerlendirilmelidir.

## KAYNAKLAR

Aktaş M, Ateş M 2005. Bitkilerde beslenme bozuklukları: nedenleri ve tanınmaları. Engin Yayınevi.

Altıkat A, Turan T Torun, F.E. ve Bingül, Z. 2009. Türkiye'de pestisit kullanımı ve çevreye olan etkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40:87-92.

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, 2019. Türkiye çevre sorunları ve öncelikleri değerlendirme raporu.

Balsari P, Tamagnone M 1997. automatic spray control for airblast sprayers: first results. In Precision agriculture'97: The first European Conference on Precision Agriculture, Warwick University Conference Centre, UK, 7-10 September 1997. Oxford; Herndon, VA: BIOS Scientific Pub., c1997.

Bolat İ, Kara Ö 2017. Bitki besin elementleri: Kaynakları, işlevleri, eksik ve fazlalıkları. Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 19:218-228.

Bouraoui F, Grizzetti B 2014. Modelling mitigation options to reduce diffuse nitrogen water pollution from agriculture. Science of the Total Environment, 468:1267-1277.

Demircan V, Yılmaz H 2005. Isparta ili elma üretiminde tarımsal ilaç kullanımının çevresel duyarlılık ve ekonomik açıdan analizi. Ekoloji, 14:15-25.

Ehlert D, Schmerler J, Voelker U 2004. Variable rate nitrogen fertilisation of winter wheat based on a crop density sensor. Precision Agriculture, 5:263-273.

Eryılmaz GA, Kılıç O 2018. Türkiye'de sürdürülebilir tarım ve iyi tarım uygulamaları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 21:624-631.

Fageria NK 2016. The use of nutrients in crop plants: CRC press.

FAO, 2020. Fertilizers by Nutrient. url: http://www.fao.org/faostat/en/#data/RFN, (04.03.2020).

Felton W, Doss A, Nash P, McCloy K 1991. A microprocessor controlled technology to selectively spot sprayer weeds. In: Automated Agr for the 21st Century Proc, ASAE:427-432.

Gezgin S 2015. Türkiye'de gübre üretim ve tüketimi, Dengeli Gübreleme, Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi:12-16.

Kacar B, Katkat AV 2007. Gübreler ve gübreleme tekniği: Nobel Yayın Dağıtım.

Karaer F, Gürlük S 2011. Gelişmekte olan ülkelerde tarım-çevre-ekonomi etkileşimi. Doğuş Üniversitesi Dergisi, 4:197-206.

Karaman S 2006. Hayvansal üretimden kaynaklanan çevre sorunları ve çözüm olanakları. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9:133-139.

Karimzadeh R, Hejazi MJ, Helali H, Iranipour S, Mohammadi SA 2011. Assessing the impact of site-specific spraying on control of Eurygaster integriceps (Hemiptera: Scutelleridae) damage and natural enemies. Precision Agriculture, 12:576-593.

Lu Y, Song S, Wang R, Liu Z, Meng J, Sweetman AJ, Jenkins A, Ferrier RC, Li H, Luo W 2015. Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. Environment international, 77:5-15.

Özgüven M, Türker U 2010. Hassas tarım teknolojilerinin üretim ekonomisi ve ülkemizde mısır üretiminde kullanılabilme olanakları. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, 7(1),55-70.

Parlakay O, Çelik A, Kızıltuğ T 2015. Hatay ilinde tarımsal üretimden kaynaklanan çevre sorunları ve çözüm önerileri. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20:17-26.

Parris K 2011. Impact of agriculture on water pollution in OECD countries: recent trends and future prospects. International Journal of Water Resources Development, 27:33-52.

Peker AE 2012. Konya ili domates üretiminde tarımsal ilaç kullanımına yönelik çevresel duyarlılık analizi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2:47-54.

Sönmez İ, Kaplan M, Sönmez S 2008. Kimyasal gübrelerin çevre kirliliği üzerine etkileri ve çözüm önerileri. Derim, 25:24-34.

Stafford J, Miller P 1993. Spatially selective application of herbicide to cereal crops. Computers and electronics in agriculture, 9:217-229.

Tanrıvermiş H 2000. Orta sakarya havzası'nda domates üretiminde tarımsal ilaç kullanımının ekonomik analizi: TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü.

TUİK, 2020. Yıllar Bazında Tarım İlacı Tüketimi. url: www.tuik.gov.tr, (04.03.2020).

Williams MM, Gerhards R, Mortensen DA 2000. Two-year weed seedling population responses to a post-emergent method of site-specific weed management. Precision Agriculture, 2:247-263.

Zalidis G, Stamatiadis S, Takavakoglou V, Eskridge K, Misopolinos N 2002. Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. Agriculture, Ecosystems & Environment, 88:137-146.

# Evaluation of the effect of coffee and carbonated beverages on calcium phosphate precipitation, in the point of formation of calculus

Busra Selmi Cepis[1*], Serap Akyuz[2], Aysen Yarat[3]

[*1]M.U. Health Science Institute, Biochemistry Master Science Student, [2]M.U. Faculty of Dentistry, Department of Clinical Sciences (Pedodontics), [3]M.U. Faculty of Dentistry, Department of Basic Medical Sciences (Biochemistry), Istanbul, Turkey

*busraselmi@gmail.com

## Abstract

The calculus is a hard and calcified accumulation of microbial dental plaque layer consisting of various inorganic components and organic matrix, mainly calcium phosphate crystals, and causes problems such as gingivitis and periodontitis. In addition, with the bad image and halitosis it creates, it affects the daily life of the people negatively. The aim of the study is to examine the effects of some types of coffee, cola, soft drink (fanta) and mineral water, which are frequently consumed in daily life, on the mechanism of nucleation and aggregation of calcium phosphate precipitation which is thought to reflect dental calculus formation *in vitro*. Calcium phosphate precipitation was investigated after mixing the appropriate concentrations of solutions containing calcium and phosphate ions by recording the absorbance change at 620 nm for 30 minutes at intervals of two minutes at 37°C. Samples, whose effects on the precipitation analysed, were evaluated by adding 50 µL to mixture. The optical density increases first with the calcium phosphate nucleation, when the balance is reached, the optical density decreases gradually when the nuclei begin to aggregate and precipitate. At the end of the experiment, charts drawn between time and absorbance and the effects of each sample on calcium phosphate precipitation were evaluated. It was determined that coffee types and mineral water inhibit calcium phosphate precipitation, and that cola and soft drink activate it. In addition to good oral care, it has being suggested that some drinks and foods consumed provide protection against dental and gum diseases. Our findings showed that the drinks consumed may have different effects on the dental calculus. For this reason, it is very important to pay attention to nutrition beside oral hygiene practices.

**Keywords:** Dental calculus, calcium phosphate precipitation, coffee types, cola, fanta, mineral water

## INTRODUCTION

In the last few years, consumption of soft drinks has increased for all ages (Barbosa and Cardoso, 2018). Caffeinated and carbonated drinks are the most popular drinks in all cultures (Ozdestan, 2014). It has been consumed by the majority of people and even worse, it has been very popular among children (Kitchens and Owens, 2007). These drinks contain excessive amounts of acidic and sweet substances, caffeine, colorants, flavors (Karimi, 2019). Although carbonated drinks are very delicious, they can be very harmful to health. These drinks threaten dental health, whether they are sweet or not. Recent research reports that carbonated drinks cause many dental and oral health problems, such as staining, cavity formation, gingival recession, and tooth erosion (Ignjatovic et al., 2002).

Coffee contains carbohydrate, fat, nitrogenous compounds, vitamins, isoflavonoids and many micronutrient compounds, especially caffeine, chlorogenic acid (CGA) and caffestol (Tsou et al., 2019). They are methylxanthine group compounds such as caffeine, theophylline and theobromine. Caffeine metabolites have been reported to have in vitro antioxidant activity, especially 1-methylxanthine and 1-methyrol (Peksever, 2017).

When consumed without additives, coffee can help prevent tooth decay and disrupt bacterial biofilm formation, causing plaques responsible for dental caries and stones. In contrast, choosing coffee with cream and sugar speeds up the growth of the bacterial plaque. For this reason, mouth and teeth should be rinsed to prevent accumulation of bacteria after the coffee is finished (Namboodiripad and Kori, 2009).

In line with changes in diets and nutritional habits in communities, dental calculus have an increasing prevalence, and causes a nonaesthetic appearance and bad breath in addition to many oral problem (Akar, 2014). Recent studies have shown that dental calculus can cause diseases such as diabetes, urinary calculus formation and cardiovascular diseases, as well as causing oral problems. Although calculus is not directly responsible for this, it is a secondary factor in disease progression (Batool et al., 2018, Clarke, 2015).

Dental calculus is the result of the interaction between calcium and phosphate ions in the oral plaque microbiota and mineralization nucleators and inhibitors in oral fluids, mineralized dental plaque as calcium phosphate precipitates. The formation of the calculus varies greatly among individuals (Wong and Sisson, 2007). Studies have shown that many factors such as age, gender, race, genetic variations, dietary habits, tobacco use, systemic diseases, drugs used, pH of saliva, composition and bacterial load, oral hygiene practices and socioeconomic status affect dental calculus formation (Akcalı and Lang, 2018).

Dental calculus is a mineralized bacterial plaque which is composed of various inorganic components, mainly calcium phosphate compound, and organic matrix (Moolya et al., 2010; White, 1997; Jin and Yip, 2002). It is very important to control the factors affecting calcium phosphate precipitation for the inhibition of calculus formation (Tarasevich et al., 2003).

In order not to allow calcium phosphate precipitation, the development of proper nutrition strategies and preventing dental calculus can be eliminated from the conditions that lead to periodontal diseases (Lieverse, 1999). In this study, the effects of three coffee and three carbonated beverages on the mechanism of nucleation and aggregation of calcium phosphate precipitation which is thought to reflect initial dental calculus formation *in vitro.*

## MATERIALS AND METHODS

### *Preparation of the coffee and carbonated beverages*

The coffees were prepared in accordance with the preparation procedure in their packages. After the coffees and carbonated drinks (cola, soft drink and mineral water) had reached room temperature, 1 mL of samples were taken in eppendorf, centrifuged for 10 min at 4000 rpm (Heraeus Instruments Biofuge pico, D-37520).

### *Screening of calcium phosphate precipitation*

The standard curve for nucleation and aggregation of calcium phosphate precipitates were obtained by recording the change in optical density at 620 nm at two-minute intervals for approximately 30 minutes using the RT-9000 Semi-auto Chemistry Analyzer instrument at 37°C. Measurements were initiated by mixing equal volumes of calcium chloride dihydrate (4 mM) and trisodium phosphate (10 mM) solutions.

The final calcium and phosphate ion concentrations were about 2 mM and 5 mM, respectively, so as to be between physiological saliva concentrations. The optical density increases with nucleation of calcium phosphate until equilibrium is reached. As the nuclei begin to aggregate and precipitate, the optical density decreases gradually.

The effects of coffees, cola, soft drink and mineral water on calcium phosphate precipitation were examined by the addition of 50 µL of them into the mixture of calcium and phosphate ions. Each sample was studied five times. After examining each sample five times, graphs drawn between time and optical density (absorbance) and the effects of each drink on calcium phosphate precipitation were statistically evaluated.

### *Statistics*

For the statistical evaluation of the data obtained as a result of the study, The Statistical Program for the Social Sciences (SPSS) (16.0, Windows) package program was used. Statistically, $p < 0.05$ was considered significant. The consistency of continuous variables to normal distribution was investigated using the Kolmogorov-Smirnov test. In the comparison of two independent groups, Student's t test was used for normally distributed variables and Mann Whitney U test was used for non-normally distributed variables. Values are given as mean ± standard deviation (SD).

## RESULTS

### *The standard curve for precipitation of calcium phosphate*

Time-course measurements of optic density obtained by 2mM of calcium and 5mM of phosphate solutions at 620 nm were illustrated in Fig 1.

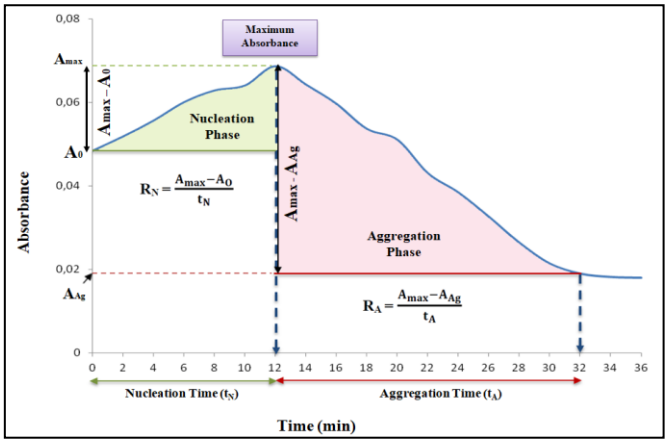



**Figure 1.** The standard curve for nucleation and aggregation phases of the formation of calcium phosphate precipitate

The increase in optical density after mixing calcium and phosphate solutions reflects the increase in the number of calcium phosphate nuclei (nucleation rate). When the optical density reaches the maximum value, the formation of calcium phosphate nuclei is completed. This is called the nucleation phase. Nucleation rate ($R_N$) is the ratio of the difference between the maximum absorbance value and the original absorbance value to the time taken to reach the maximum absorbance value ($t_N$).

The optical density gradually decreases over time, which reflects the reduction of the number of nuclei dispersed in solution due to the accumulation of calcium phosphate nuclei. This is called the addition phase. This is called aggregation phase. $R_A$ is the ratio of the difference between the maximum absorbance value and the absorbance value where the optical density no longer decreases to the time taken to decrease the maximum absorbance ($t_A$).

### *Effects of coffees and carbonated beverages calcium phosphate precipitation*

The effects of Turkish coffee, Nescafe gold, Nescafe 3in1, cola, soft drink and mineral water are shown in the Fig. 2. Compared to standard curve, all coffee prolonged nucleation time, decreased the nucleation rate significantly. Cola shortened nucleation time and soft drink shorthened aggregation time significantly. The increase in the aggregation rate for cola was significantly more than soft drink (Table 1 and Figure 2).

**Table 2**. The effects of coffee and carbonated beverages on the nucleation and aggregation phases of calcium phosphate precipitation

| | Standard (Calcium phospahte without extracts) | Turkish coffee | Nescafe gold | Nescafe 3in1 | Cola | Soft drink | Mineral water |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nucleation rate ($R_N$) ($\times 10^{-3}$/min) | 1,66 ± 0,69 | 4,04±0,82**[b] | 3,76±0,09**[b] | 6,24±0,19**[b], ##[b], □□[b] | 4,56±1,30**[b] | 5,92± 1,18**[b] | 3,22±0,38**[b] |
| Aggregation rate ($R_A$) ($\times 10^{-3}$/min) | 2,68 ± 0,35 | 5,32±2,19**[a] | 8,36±1,39**[b], #[a] | 21,52±4,28**[b],##[b],□□[b] | 4,82±1,78*[a] | 9,02±1,64**[b], φφ[b] | 5,52±0,65**[b] |
| Nucleation time ($t_N$) (min) | 12,80 ± 1,78 | 32,20±3,49**[b] | 31,60±0,89**[b] | 24,00±2,44**[b],##[b],□□[b] | 6,00±0,00**[b] | 12,00 ± 0,00 | 14,00 ±0,00 |
| Aggregation time ($t_A$) (min) | 21,20±2,04 | 29,80±3,25*[a] | 18,40±1,49##[a] | 13,60±1,49**[b],##[b],□□[a] | 19,2±0,98 | 9,60±0,80**[a], φφ[b] | 30,8±0,98**[b] |

Values was given as mean ± standard deviation.
*p<0.05, ** p<0.01: Significantly different from standard.
#p<0.05, ##p<0.01: Significantly different from Turkish coffee.
εεp<0.01: Significantly different from Nescafe gold.
φφp<0.01: Significantly different from cola.

[a]Student t test, [b]Mann Whitney U test

## DISCUSSION

Calcium and phosphate concentrations in saliva are known to be effective in the formation of calculus (Wong and Sisson, 2007). Physiologically normal $Ca^{2+}$ and $PO_4^{3-}$ ion concentrations in saliva has been reported to be 1.03–3.6 mM and 4.5-6 mM, respectively. Any imbalance in these concentrations creates various problems in terms of dental and oral health, especially the formation of calculus. Calcium phosphate supersaturation, which occurs as a result of increased $Ca^{2+}$and $PO_4^{3-}$ ion concentration in saliva, is a thermodynamic driving factor for dental calculus formation (Morta et al., 2018). Preliminary experiments were carried out with different concentrations of these two ions to obtain a standard curve in which the nucleation and aggregation phases of calcium phosphate precipitation can be monitored in a short time interval and well. Ultimately for the final concentration in the mixture, 2 mM calcium and 5 mM phosphate ion concentrations were found suitable for obtaining the standard calcium phosphate precipitation curve. To examine the effect of coffees, cola soft drink and mineral water, this standard curve was used for comparison in the present study.

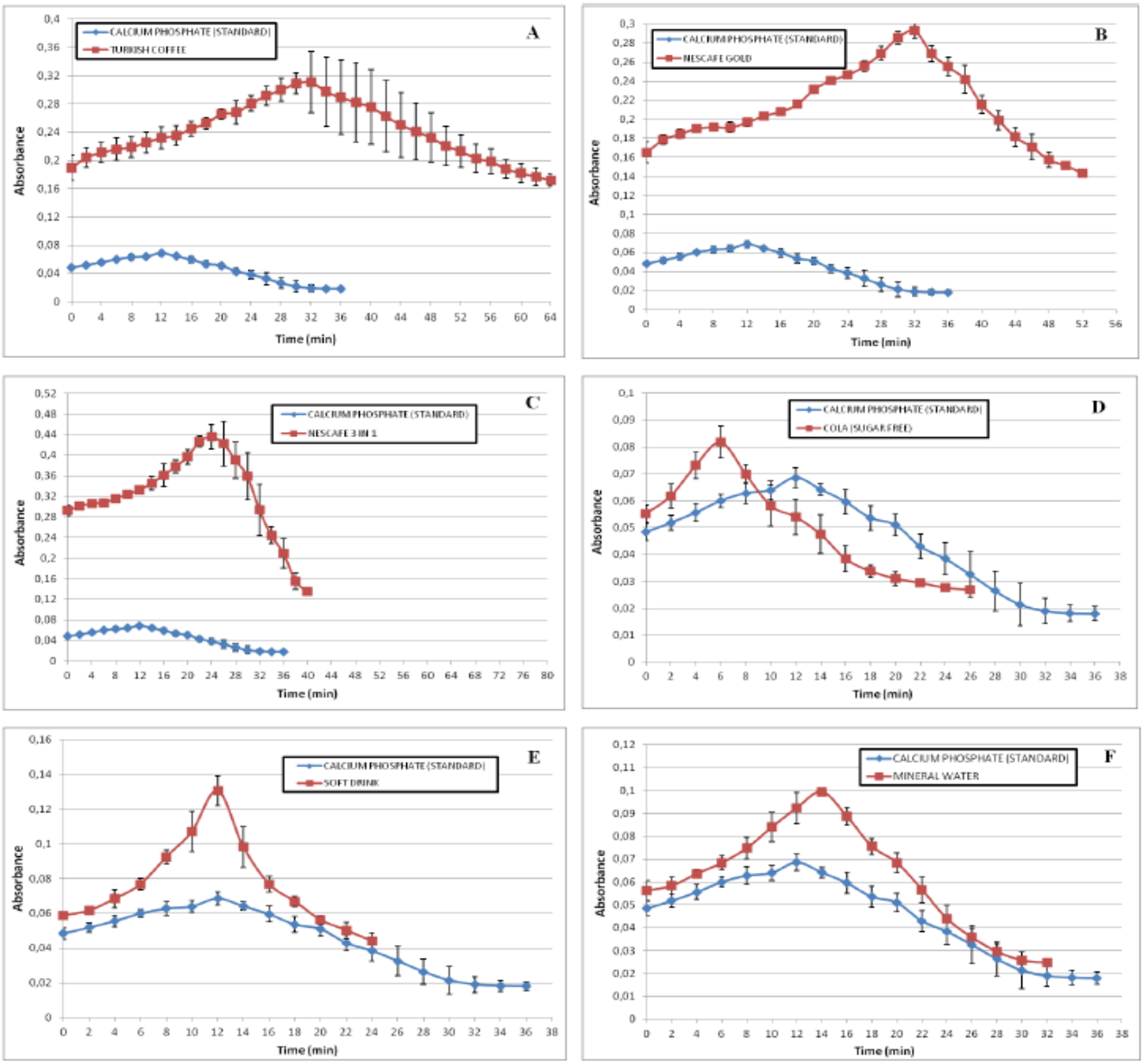



**Figure 2.** (A) The effect of Turkish coffee, (B) The effect of Nescafe gold, (C) The effect of Nescafe 3in, (D) The effect of cola (sugar free), (E) The effect of soft drink, (F) The effect of mineral water on calcium phosphate precipitation.

Carbonated beverages contain high amounts of sugar, calories and caffeine, and provide no valuable nutrition. It is a mixture of water, sugar, colouring and flavouring agents and carbon dioxide which due to the presence of colored materials and carbon dioxide, can lead to disorders such as osteoporosis, urticaria, respiratory,

gastrointestinal and behavioral complications. The active ingredient in these beverages is phosphoric acid, with an acidic pH generally less than three, which is same as acetic acid (Damle et al., 2011).

It has been reported that the rate of caries in teeth and erosive lesions increase with the increasing consumption of carbonated beverages. These drinks have a low pH and are flavored with refined carbohydrates. These carbohydrates are metabolized by plaque microorganisms to form organic acids. Also carbonated beverages contain dissolved carbon dioxide, carbonic acid. Inorganic acids such as phosphoric acid are used to adjust the flavors of these beverages. Beverages with fruit flavors or high sugar concentrations contain organic acids such as citric (orange), tartaric (grape), maleic (apple) and ascorbic acid (vitamin C) as additives. These organic and inorganic acids owned by carbonated beverages change the saliva pH and composition, causing dental caries and various dental problems (tooth color change, decay, erosion etc.) (Kitchens and Owens, 2007; Hanin and Thenmozhi, 2018). In a study, it has been reported that carbonated drinks contain high concentrations of citric acid in particular cola have an abrasive effect on enamel and significantly reduces the surface hardness of dental materials used in enamel, dentin and filling (Wongkhantee et al., 2006).

In our study, it was observed that cola and soft drink increased the rate of calcium phosphate precipitation reaction. The activator effect of the cola was found to be higher than soft drink . This may be due to the inhibitory effect of citric acid contained in soft drink on calcium phosphate precipitation. Some studies in the literature also report that citric acid inhibits calcium phosphate precipitation (Van der Houwen and Valsami-Jones, 2001; Gholami et al., 2018; Doizi et al., 2018).

The effect of mineral water on calcium phosphate precipitation is similar to the standard solution, causing a slight increase in reaction time. The bicarbonate ions its contains are thought to be effective in the inhibitory effect of mineral water, due to the common ion effect. Amjad (1988) reported that calcium carbonate is inhibitory in the precipitation of calcium phosphate compound, but there is a significant decrease in inhibition as the temperature increases. Since we carried out our study at 37°C in order to reflect the oral environment conditions, the inhibitory effect of mineral water may be reduced. At the same time, as in all the beverages we use in our study, we included mineral water in the reaction medium after reaching room temperature. We think that the inhibitory effect of mineral water normally consumed as cold may be more.

Coffee can help prevent tooth decay when consumed without additives for American Dental Association. However, dental health and coffee relationship is a matter of curiosity due to the stains and yellowing that coffee can create on the teeth. This situation, which disrupts dental aesthetics, has created a completely negative bias in terms of dental health and coffee (Karadas and Seven, 2014).

One of the most popular beverages in the world, coffee has been consumed for more than 1000 years. Coffee contains carbohydrate, fat, nitrogenous compounds, vitamins, isoflavonoids and many micronutrient compounds, especially caffeine, coffee, chlorogenic acid (CGA) and caffeastol. They are methylxanthine group compounds such as caffeine, theophylline and theobromine. Caffeine metabolites have been reported to have *in vitro* antioxidant activity, especially 1-methylxanthine and 1-methyrol (Peksever, 2017). There are 80 different types of coffee tree. Gold coffee obtained by grinding 100% Coffea arabica beans contains 0.9-1.3 grams of caffeine in 100 grams (Peksever, 2017). Turkish coffee is a method of preparation, not a type of coffee. Therefore, for Turkish coffee, coffea arabica is used (Özdestan, 2014).

In our study, it was observed that these three types of coffee, especially Turkish coffee, slowed down the calcium phosphate precipitation reaction. However, Turkish coffee showed the highest inhibitory effect and Nescafe 3in1 showed the lowest inhibitory effect. It was observed that the inhibitory effect of plain Nescafe gold was close to Turkish coffee. In studies investigating the effects on calculus formation, it has been determined that polyphenolic compounds have a potential like anti-calculus in preventing calcium phosphate precipitation (Hidaka et al., 1996; Anushya and Freeda, 2017; Torki et al., 2018). The polyphenol source chlorogenic acid, which is also included in the inhibitory effect of coffee, is thought to be effective. The inhibitory effect sequence is also compatible with the polyphenol content of coffee types. In addition, chlorogenic acid is beneficial for oral health with its antioxidant, antibacterial and anticarcinogenic effects (Sözlü et al., 2017).

Although there are many studies on the effect of coffee on general dental and oral health, there are no studies in the literature investigating the effect of coffee or caffeine on dental calculus formation. In a study, it has been reported that coffee prepared with roasted coffee beans has an antibacterial effect due to its tannins, catechins and polyphenolic components (Kashket et al., 1985). These components, which have coffee, are also thought to be effective in calcium phosphate precipitation (Hidaka et al., 1996). Another study found that

coffee has an anti-carious effect on humans. As a result, it is reported that if consumed alone, coffee has an anticaries effect but the antibacterial and anticaries effect decreases in the presence of additives (Namboodiripad and Kori, 2009). In our study, in which we compared coffee types in terms of its effect on dental calculus formation, the inhibitory effect of plain coffee was found to be higher than that of coffee with cream and sugar. These results have shown that, among other benefits, Turkish coffee and Nescafe gold coffee can also be effective in preventing dental calculus. Choosing creamy and sweetened coffee accelerates the growth of the bacterial plaque. Mouth and teeth should be rinsed to prevent bacterial accumulation and calculus formation after consuming coffee with additives.

According to the results of our study, it has been determined that carbonated beverages such as cola and soft drink have the potential to create dental calculus, mineral water does not have a negative effect in terms of dental calculus formation, it is important to limit the consumption of these drinks in daily life and/or not to neglect oral hygiene practices after consumption. However, daily amounts should be well optimized in consumption of caffeinated beverages, as the pH values below saliva critical pH of 5.5, as seen in addition to their ability to prevent calculus, increase the risk of dissolution of tooth enamel.

## CONCLUSION

The results of our study showed that three types of coffee and mineral water can be inhibitor effect on the calcium phosphate precipitation which may reflects dental calculus formation, and carbonated beverages (cola and soft drink) can be activator effect. Still, more work needs to be done. Our study is the first approach to examine the effects of caffeinated and carbonated beverages on dental calculus in terms of their effects on calcium phosphate precipitation, but it is also important to show that more beverages can be examined.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Marmara University Scientific Research and Project Commision (Project No:SAG-C-YLP-120619-0219).

## REFERENCES

Akar Ç 2014. Türkiye'de ağız-diş sağlığı hizmetlerinin strateji değerlendirmesi. Türk Diş Hekimleri Birliği Yayınları Araştırma Dizisi, 9(11): 1-12.

Akcali A, Lang NP 2018. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. Periodontology 2000,76: 109-115.

Amjad N 1988. Effect of precipitation inhibitors on calcium phosphate scale formation. Journal of Chemistry, 67: 850-856.

Anushya G, Freedo TH 2017. Effect of green tea on the growth of brushite crystals. Internatıonal Journal of Latest Trends in Engıneerıng and Technology, Special issue: 139-143.

Barbosa GF, Cardoso MB 2018. Effects of carbonated beverages on resin composite stability. American Journal of Dentistry, 31(6), 313–316.

Batool H, Nadeem A, Kashif M, Shahzad F, Tahir R, Afzal N 2018. Salivary levels of IL-6 and IL-17 could be an indicator of disease severity in patients with calculus associated chronic periodontitis. BioMed Research International, 1-5.

Clarke MR 2015. Dental Calculus: Combınıng Current Methods in The Study of Diet and Mouth Use Activities Among Neolithic and Early Bronze Age Hunter-Gatherers of The Cıs-Baikal, Siberia. University of Saskatchewan. Department of Archaeology and Anthropology, Thesis Submitted to the College of Graduate Studies and Research, Saskatoon.

Damle SG, Bector A, Saini S 2011. The effect of consumption of carbonated beverages on the oral health of children: A study in real life situation. Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic, 11(1): 35-40.

Doizi S, Poindexter JR, Pearle MS, Blanco F, Moe OW, Sakhaee K, Maalouf NM 2018. Impact of potassium citrate vs citric acid on urinary stone risk in calcium phosphate stone formers. The Journal of Urology, 200(6): 1278-1284.

Gholami GA, Karamlou M, Fekrazad R, Ghanavati F, Hakimiha N 2018. Comparison of the effects of Er,Cr:YSGG Laser and super-saturated citric acid on the debridement of contaminated implant surfaces. Journal of Lasers in Medical Sciences, 9(4): 254-260.

Hanin SMA, Thenmozhi MS 2018. Association between dental erosion and carbonated drinks. Drug Invention Today,10(11): 2335-2337.

Hidaka S, Nishimura H, Nakajima K, Liu SY 1996. Effects of a rhubarb *(rhei rhizoma)* solution and its fractions on the formation of calcium phosphate precipitates. Journal of Periodontal Research, 31: 408-413.

Ignjatović Z, Stojšin I, Brkanić T, Lončar J 2012. The effect of excessive coca-cola consumption on the development of dental erosions. Serbian Dental Journal, 59(3): 148-153.

Jin Y, Yip HK 2002. Supragingival calculus: formation and control. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 13(5): 426-441.

Karadas M, Seven N 2014. The effect of different drinks on tooth color after home bleaching. European Journal of Dentistry, 8(2): 249-253.

Karimi M 2019. Why drinking carbonated beverages and energy drinks are detrimental to children's oral health?. ECronicon Paediatrics, 8(6): 537-543.

Kashket S, Paolino VJ, Lewis DA, Van-Houte J 1985. In vitro inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium Streptococcus mutans by common beverages and food extracts. Archives of Oral Biology, 30(11-12): 821-826.

Kitchens M, Owens BM 2007. Effect of carbonated beverages, coffee, sports and high energy drinks and bottled water on the *in vitro* erosion characteristics of dental enamel. Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 31(3): 153-159.

Lieverse AR 1999. Diet and the aetiology of dental calculus. International Journal of Osteoarchaeology, 9: 219-232.

Morta S, Mante K, Rasa B, Gintaras J 2018. The influence of salivary pH and calcium/phosphate ions concentration on salivary gland stones' formation. International Journal of Dental Medicine, 5(1): 30-38.

Namboodiripad PCA, Kori S 2009. Can coffee prevent caries?. Journal of Conservative Dentistry,12(1): 17-21.

Ozdestan Ö 2014. Evaluation of bioactive amine and mineral levels in Turkish coffee. Food Research International, 61: 167-175.

Peksever D 2017. Kahve ve Çay Tüketiminin Tip 2 Diyabet ve İnsülin Direnci Olan Bireyler Üzerine Etkisi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

Sözlü S, Yılmaz B, Tek NA 2017. Kahve tüketimi ve bazı hastalıklarla ilişkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8(2): 33-39.

Tarasevich BJ, Chusuei CC, Alloro DL 2003. Nucleation and growth of calcium phosphate from physiological solutions onto self-assembled templates by a solution formed nucleus mechanism. Journal of Physical Chemistry, 107: 10367-10377.

Torki A, Hosseinabadi T, Fasihzadeh S, Sadeghimanesh A, Wibowo JP, Lorigooini Z 2018. Solubility of calcium oxalate and calcium phosphate crystallization in the presence of crude extract and fractions from *Kelussia odoratissima Mozaff*. Pharmacognosy Research,10(4): 379-384.

Tsou SH, Hu SW, Yang JJ, Yan M, Lin YY 2019. potential oral health care agent from coffee against virulence factor of periodontitis. Nutrients, 11(9): 2235.

Van der Houwen JAM, Valsami-Jones E 2001. Precipitation chemistry to phosphorus recovery: the influence of organic ligands. Environmental Technology, 22(11): 1325-1335.

White DJ 1997. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. European Journal of Oral Sciences, 105(5): 508-522.

Wong L, Sissons CH 2007. Human dental plaque microsoms biofilms: effect of nutrient variation on calcium phosphate deposition and growth. Archives of Oral Biology, 52: 280-289.

Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D 2006. Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. Journal of Dentistry, 34(3): 214-220.

# Comperative Study of Tungsten Sulfide Based Catalysts for Photocatalytic Hydrogen Evolution

Gizem Yanalak[1*], Emre Aslan[1], Adem Sarılmaz[2], Faruk Ozel[2], İmren Hatay Patır[3]

[1]Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Konya, Turkey.
[2]Karamanoglu Mehmetbey University, Faculty of Engineering, Department of Metallurgical and Materials Engineering, Karaman, Turkey.
[3]Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biotechnology, Konya, Turkey.

*Corresponding author e-mail: gizemyanalak@gmail.com

## Abstract

Four types of tungsten sulfide based ($NiWS_x$, $CoWS_x$, $FeWS_x$ and $MnWS_x$) catalysts have been synthesized by the hot-injection technique and characterized by using Transmission Electron Microscopy (TEM) and X-ray Powder Diffraction (XRD) and Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX). These catalysts were tested for the photocatalytic hydrogen generation from water under visible light irradiation. The photocatalytic reactions were performed by using Eosin-y dye as a photosensitizer and triethanolamine as a hole scavenger. The HER rates of catalysts have been found as 249 $\mu molg^{-1}h^{-1}$, 201$\mu molg^{-1}h^{-1}$, 901 $\mu molg^{-1}h^{-1}$ and 646 $\mu molg^{-1}h^{-1}$ for the $MnWS_x$, $FeWS_x$, $CoWS_x$ and $NiWS_x$, respectively. The differences of photocatalytic activities in tungsten sulfide group is thought to be related to increasing the surface area of the catalyst by providing better load separation.

**Keywords:** photocatalytic, hydrogen evolution, tungsten sulfide

## INTRODUCTION

Hydrogen is considered to be an ideal energy carrier because of its numerous advantages, such as pollution-free, sustainability and efficiency properties. To date, Pt-group metals (Pt, Ru, Rh, Ir, and Pd) are used as an extremely effective catalysts for photocatalytic water-splitting reaction due to the its low overpotential for proton reduction. In spite of that, Pt-group metals are expensive metals in limited supply. Therefore, a lot of research has been carried out to find inexpensive, abundant, efficiency and visible light driven photo/catalysts in recent years. In overcome this barrier, the dye sensitization of semiconductor for the sunlight-driven hydrogen production has been regarded to help in solving current energy crisis. In the dye sensitized systems, after photoexcitation of dye molecule, stimulated of an electron from the LUMO level of the dye are transferred through the conduction band of semiconductor. There the dye molecule has a dual role; as a sensitizer, it absorbs visible light, and as a molecular bridge it attaches semiconductor photocatalyst with an electron donor (Youngblood et al.). The oxidized dye molecule is reduced to the HOMO level by electron transfer from electron donor (Chowdhury et al.). The stimulated electrons on the conduction band of catalyst are migrated to the active sites of catalyst and these electrons can reduced water to hydrogen.

In this report, we provide $MWS_X$ (M=Ni, Co, Fe, Mn) catalysts for photocatalytic hydrogen reaction and they have been synthesized by hot-injection technique. The morphological properties have been characterized by using Transmission Electron Microscopy (TEM), Energy-dispersive X-ray (EDX) and X-ray Powder Diffraction (XRD). The photocatalytic hydrogen activities of $MWS_X$ catalysts have been evaluated by using TEOA as a hole scavenger and Eosin-Y (EY) as a sensitizer under visible light irradiation. The photocatalytic hydrogen activities of catalysts are changed in order of $NiWS_X > CoWS_X > FeWS_X > MnWS_X$.

## MATERIALS AND METHODS

Photocatalytic hydrogen production experiments were performed in the presence of $MWS_X$ (X=Ni, Co, Fe, Mn) catalysts, TEOA as a sacrificial agent and EY as a photoabsorber. Experiments typically were carried out in the glovebox and 10 mg of the $MWS_X$ (M=Ni, Co, Fe, Mn) catalysts, TEOA solution (pH 9) and Eosin-Y dye solution were added in the reaction bottle. After this step, mixed solution was closed with septum and it was sonicated in order to get a homogenous. The reaction bottle was illuminated under the UV lamp. The amount of produced hydrogen was analyzed by gas chromatography (Shimadzu GC-2010 Plus, using a RESTEK molecular sieve 5A porous layer open tubular capillary column 30 m 0.53 mm ID 50 mm df as a column at 323 K thermal conductivity detector (TCD) and argon as the carrier gas).

## RESULTS and DISCUSSION

The morphological properties of transition metal incorporated into sulfide nanostructures were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The obtained TEM images indicated that $MWS_x$ nanostructures are a variety of size with rod-like shapes (Figure 1)

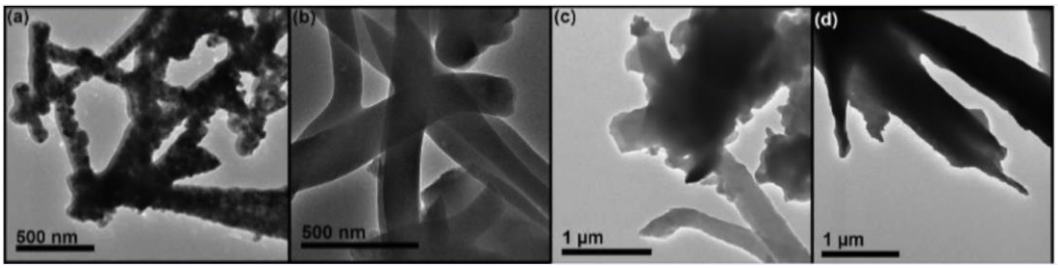



**Figure 1.** TEM images of $MWS_x$ catalysts

The crystal phases of $MWS_x$ materials were analyzed by using X-ray diffraction (XRD) characterization method. According to XRD results, although few partial diffraction peaks were seen caused by regional crystallizations, all of the $MWS_x$ have an amorphous structure (Figure 2a). Energy-dispersive X-ray (EDX) spectra of $MWS_x$ materials have been given in the Figure 3 and the distributions of the transition elements (Ni−Co−Fe−Mn−W) with S in the $MWS_x$ are well in accordance to the element profiles (Figure 2b).

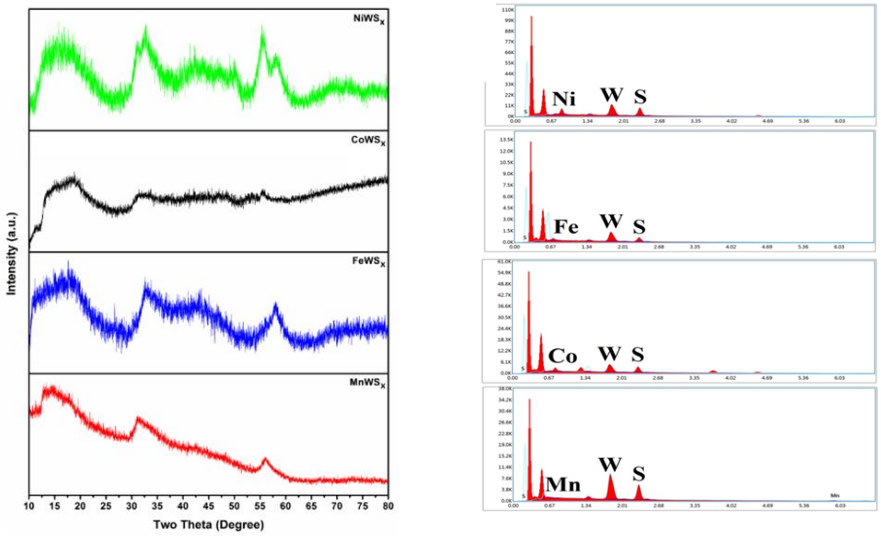



**Figure 2. (a)** XRD spectrums of $MWS_x$ catalysts and **(b)** EDX spectrums of $MWS_x$

In order to explore the photocatalytic activities of $MWS_x$ catalysts, each material have been investigated by using TEOA as an electron donor and EY as a photoabsorber under the visible light irradiation. The HER rates of $NiWS_x$, $CoWS_x$, $FeWS_x$ and $MnWS_x$ were found to be 0.646 mmol $g^{-1}$, 0.901 mmol $g^{-1}$, 0.201 mmol $g^{-1}$ and 0.249 mmol $g^{-1}$, respectively. After the 8 h, the amount of hydrogen with $NiWS_x$, $CoWS_x$, $FeWS_x$ and $MnWS_x$ catalysts were detected as the 5.906 mmol $g^{-1}$, 2.409 mmol $g^{-1}$, 1.428 mmol $g^{-1}$, 0.879 mmol $g^{-1}$, respectively. (Table 1, Figure 3a) Because of the remove of bromine ions from the dye and formation of floroscein like species, the characteristic peak of EY shifts to 490 nm from 520 nm as shown in Figure 3b.

**Table 3**. The HER rates comparison of $MWS_x$ catalysts

| Catalysts | Amount of hydrogen ($mmolg^{-1}h^{-1}$) | Amount of hydrogen ($mmolg^{-1}$ after 8 hours) |
|---|---|---|
| $NiWS_x$ | 0.646 | 5.906 |
| $CoWS_x$ | 0.901 | 2.409 |
| $FeWS_x$ | 0.201 | 1.428 |
| $MnWS_x$ | 0.249 | 0.879 |

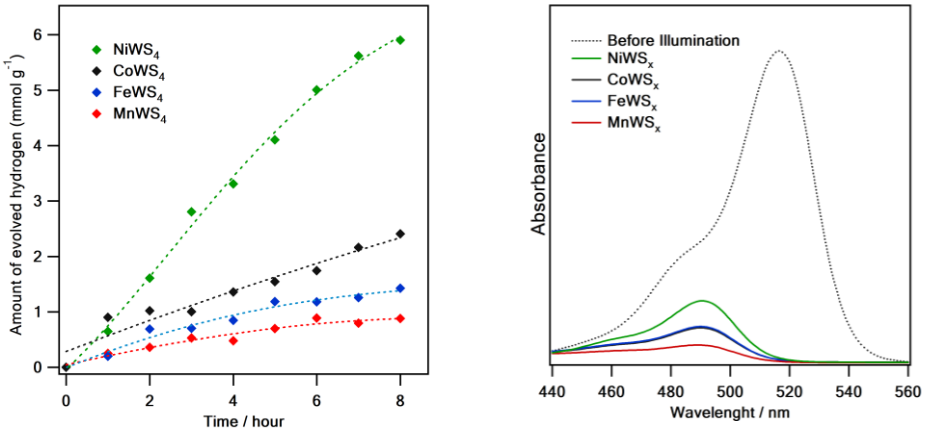



**Figure 3. (a)** Photocatalytic hydrogen production amounts of tunsten sulfur based catalysts during 8 hours under visible light illumination, **(b)** UV-Vis absorption spectra of reaction solution before and after 8 h photocatalytic hydrogen evolution reaction.

## CONCLUSION

The $MWS_X$ (M=Ni, Co, Fe, Mn) catalysts have been used for HER in the presence of TEOA electron donor and EY photoabsorber in the absence of cocatalysts. The hydrogen evolution activities of $MWS_X$ (M=Ni, Co, Fe, Mn) catalysts have been changed in the order of $NiWS_x > CoWS_x > FeWS_x > MnWS_x$. and the differences of HER rates are explained by increasing the surface area of the catalyst by providing better load separation of Ni and Co.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey) (Grant number: 215M309) for supporting this work. This paper is the part of M.A. thesis prepared by Gizem Yanalak.

## REFERENCES

Chowdhury P; Gomaa H; Ray AK, 2015. Sacrificial hydrogen generation from aqueous triethanolamine with Eosin Y-sensitized $Pt/TiO_2$ photocatalyst in UV, visible and solar light irradiation. Chemosphere, 121: 54-61.

Youngblood WJ; Lee S-HA; Maeda K; Mallouk TE, 2009. Visible light water splitting using dye-sensitized oxide semiconductors. Acc. Chem. Res, 42: 1966-1973.

# Kuşburnu ekstraktı kullanılarak grafenin yeşil sentezi

Ferda Mindivan[1*], Meryem Göktaş[2], Dilek Ünal[3]

[*1]Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bilecik, Türkiye
[2]Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Makine ve Metal Bölümü, Metalurji Programı, Bilecik, Türkiye
[3]Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilecik, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail:ferda.mindivan@bilecik.edu.tr

**Özet**

Grafen oksidin kimyasal olarak indirgenmesi için toksik, çevreye ve insan sağlığına zararlı maddeler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, indirgenmiş grafen oksitin (RGO) hazırlanması için doğal ve zararsız olan kuşburnu ekstraktı indirgeyici madde olarak kullanılarak, bir yeşil sentez yaklaşımı rapor edilmiştir. Kuşburnu, askorbik asit içeren en zengin kaynaklardan biridir. Bu çalışmada grafen oksitin RGO' ya dönüşümü aynı deneysel şartlar altında hazır temin edilen askorbik asit ve kuşburnu ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hazırlanan RGO örneklerinin termal özellikleri karşılaştırılmıştır. SEM görüntüleri ve XRD analiz sonuçlarına göre RGO örnekleri başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Ancak Van der Waals' kuvvetlerinin etkisi kuşburnu ekstraktı ile sentezlenen RGO yüzeyinin daha yoğun tabakalı bir yapıya sahip olmasına sebep olmuştur. Hazır temin edilen askorbik asit ile sentezlenen RGO örneğinin termal kararlılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Termal kararlılığın önemli olmadığı durumlarda büyük çapta uygulamalar için kuşburnu ekstraktı ile sentezlenen RGO kullanımı bu çalışmanın bir sonucu olarak önerilebilir.
**Anahtar Kelimeler:** İndirgenmiş grafen oksit, Askorbik asit, Kuşburnu ekstraktı, Termal kararlılık

## Green synthesis of graphene using rosehip extract

**Abstract**

Materials which are highly toxic and harmful to the environment and human health are used for the chemical reduction of graphene oxide. In this study, rosehip extract, as a natural and harmless reductant, mediated facile and green approach for the preparation of reduced graphene oxide (RGO) was reported. Rosehip is one of the richest sources for ascorbic acid. The conversion of the graphene oxide to RGO was achieved by using purchased ascorbic acid and rosehip extract under same experimental conditions. And also, the thermal properties of prepared RGO samples were compared. According to the results of SEM images and XRD analysis, the RGO samples were successfully obtained. However, the effect of Van der Waals' forces caused the RGO that synthesized with rosehip extract its surface had dense layered structure. The RGO that synthesis purchased ascorbic acid exhibited better thermal stability. In condition where thermal stability is not important, instead of ascorbic acid, rosehip extract can be suggested for large-scale applications as a result of this work.

**Keywords:** Reduced graphene oxide, Ascorbic acid, Rosehip extract, Thermal stability

## GİRİŞ

Grafen, önemli fiziksel özellikleri, yüksek termal iletkenliği ve yüksek Young modülüyle bilinen en üstün özellikli malzemedir. (Tahriri ve ark., 2019; Dasari ve ark., 2017) Grafenin, GO ve RGO isimli iki ana türevi vardır. GO oksidasyon reaksiyonu ile, RGO ise indirgenme reaksiyonu ile elde edilmektedir (Tahriri ve ark., 2019). GO' nun kimyasal yolla indirgenmesi, hidrazin, di-metil hidrazin, sodyum borohidrit, hidrokinon, metal hidridler (Dasari ve ark., 2017; Mindivan ve Göktaş, 2019) dahil olmak üzere yüksek derecede toksik ve kararsız maddelerin varlığında gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda, havuç, üzüm, aloe-vera vb. bitki özlerinin kullanılması ile RGO sentezi için çevre dostu yaklaşımlar geliştirmektedir. (Kurmarayuni ve ark.,2020) RGO, GO' ya göre daha az oksijen içeren gruplara sahiptir bu yüzden GO oldukça hidrofilik iken, hidrofobik yapıya sahip olan RGO (Sing, 2011) polimer matriks de topaklaşma eğilimi göstermektedir. Bu nedenle, RGO' nun polimer matrisindeki dağılımını ve RGO-polimer matris arasındaki arayüz etkileşimini geliştirmek için yeşil yaklaşımlar büyük önem taşımaktadır (Cheng ve ark., 2020; Lee ve ark., 2019). Literatürde Ismail (2019),

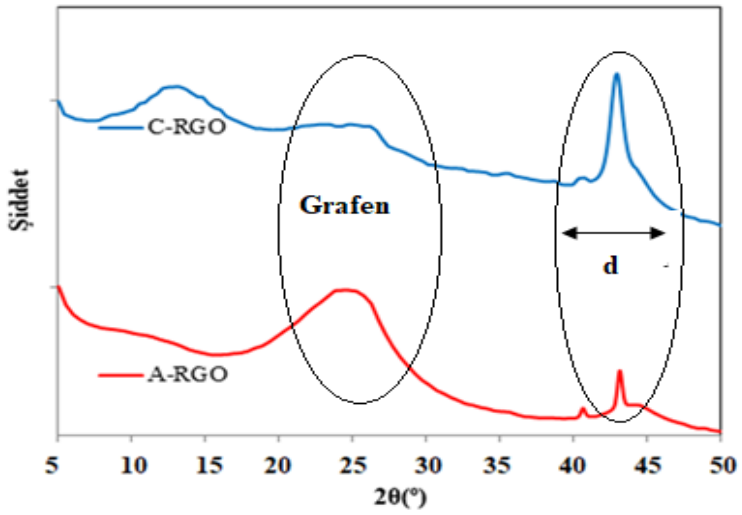
RGO sentezinde 63 tür bitki ekstraktının kullanıldığını gösteren bir çalışma yapmıştır. Bu makalede incelenen türler hariç, Cheng ve ark. (2020) lak ağaçlarının özünden elde edilen urushiol, Rattan ve ark. (2019) taze zencefil ve sarımsak özlerini ve ayrıca Amir Faiz ve ark. (2020) yeşil indirgeyici madde olarak palmiye yağı yapraklarını kullanmışlardır. Bu çalışmada hazır satın alınan askorbik asit ile kuşburnu ekstraktı kullanılarak RGO sentezi gerçekleştirilmiş ve termal özellikleri karşılaştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

GO modifiye Hummers yöntemi ile sentezi ve askorbik asit ile sentezlenen RGO' nun indirgenme reaksiyonunun ayrıntıları daha önceki çalışmalarda verilmiştir (Mindivan ve Göktaş, 2019(a); Mindivan ve Göktaş, 2019(b)). Kurutulmuş kuşburnu meyveleri ise yerel bir marketten satın alınmıştır. Ardından havanda sıvı azot ile öğütülmüştür. 250 mg GO, 100 mL saf su içinde 1 saat ultrasonik banyoda dağıtılmıştır. Ardından 250 mg kurutulmuş kuşburnu ekstraktı GO dispersiyonuna eklenmiştir. Karışım 8 saat süreyle 97° C' de bir yağ banyosu içinde geri soğutucu altında karıştırılmıştır. Hazır satın alınan askorbik asit ile sentezlenen RGO örneği C-RGO, azot ortamında üretilen kuşburnu ekstraktından sentezlenen RGO ise A-RGO olarak kodlanmıştır. XRD ölçümleri CuKα (λ:1,5404) radyasyon kaynaklı PAN analytical, Empyrean marka cihaz ile yapılmıştır. Ölçüm değerleri 2θ=5°-50º tarama aralığında ve 2º/dk' lık tarama hızında elde edilmiştir. Tozların yüzey görüntüleri SEM, Supra 40VP, Zeiss cihazı ile incelenmiştir. RGO örneklerinin termal davranışı TGA, Hitachi STA 7300 ile incelenmiştir. Termal analizler 10 °C/dak ısıtma hızı ile azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

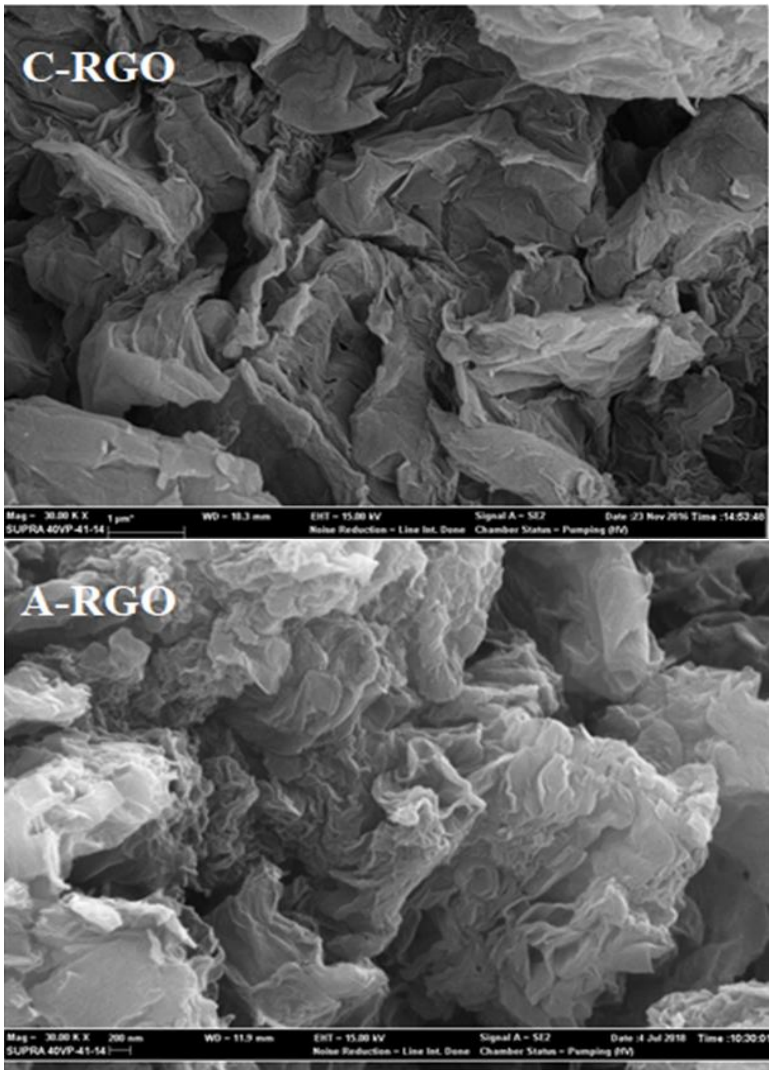
RGO örneklerinin XRD difraktogramları Şekil 1'de verilmiştir. C-RGO örneğinin XRD difraktogramında 2θ°=10-15° arasında genişlemiş bir pik ve 2θ°=42.90°' de keskin bir kırınım piki görülmüştür. Genişlemiş pik GO' nun indirgeme reaksiyonu sonucunda yapısının bozulduğunu, keskin pik ise reaksiyon sonucunda grafen tabakalarının yeniden istiflemesini göstermiştir (Stobinski ve ark., 2014) (Şekil 1). A-RGO' nun XRD difraktogramında ise 2θ°= ~26°' de grafenin varlığını yani indirgenme reaksiyonunun başarılı şekilde gerçekleştiğini kanıtlayan oldukça genişlemiş bir difraksiyon piki görülmüştür (Hu ve ark., 2014). 2θ°=43.1°'de görülen pik ise C-RGO' da aynı derecede görülen pik ile karşılaştırıldığında tabakalar arası mesafenin azaldığı ortaya çıkmıştır. Bu yüzden A-RGO örneğinde grafen tabakalarının yeniden istiflenmesi C-RGO örneğine göre daha fazla olmuştur (Hou ve ark., 2016). Bu sonuç örneklerin SEM görüntüleri ile de desteklenmiştir.




**Şekil 1.** RGO örneklerine ait XRD difraktogramı

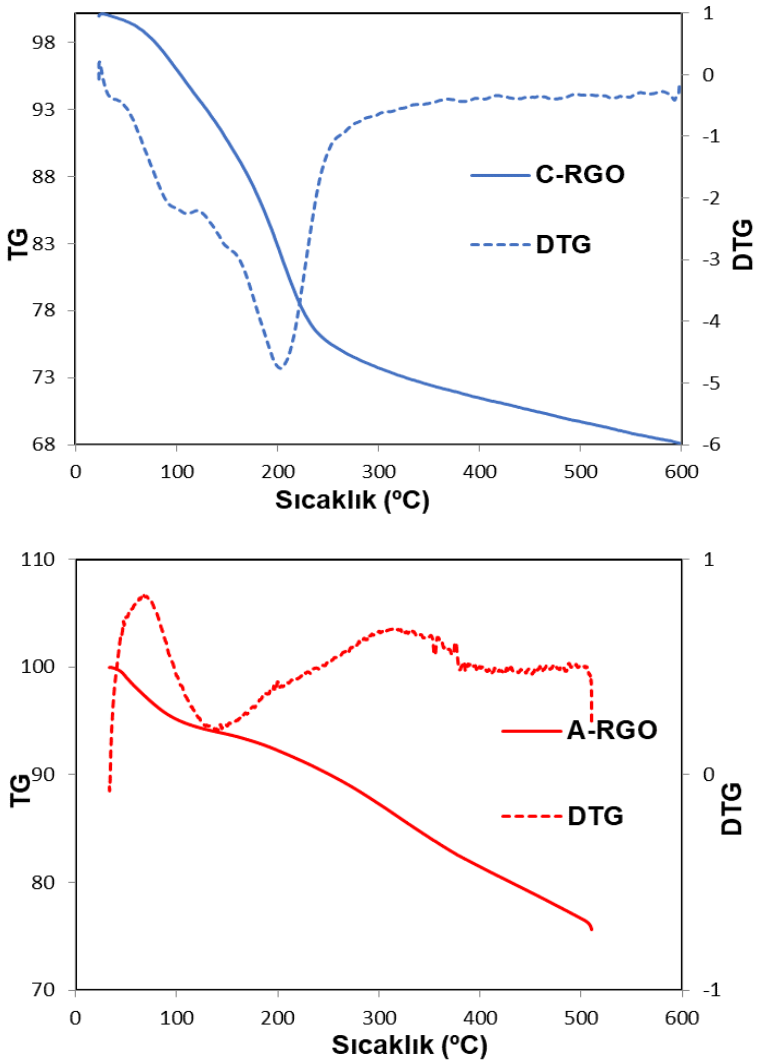
RGO örneklerinin aynı büyütmedeki (30.00 K X) SEM görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir. Her iki RGO örneğinin yüzey görüntüleri incelendiğinde oksijen içeren fonksiyonel grupların uzaklaştığını gösteren

buruşuk ve rastgele topaklanmış bir görüntü mevcuttur. Elde edilen RGO örneklerinin bu görüntüleri literatürle uyumludur (Mindivan, 2016). C-RGO ve A-RGO örneklerinin yüzey görüntüleri karşılaştırıldığında, A-RGO örneği daha buruşuk ve yoğun istiflenmiş katmanlı tabaka yapısı göstermektedir. Bu durum reaksiyon sırasında Van der Waals' kuvvetlerinin etkisinin artması sonucunda tabakaların kendi kendine bir araya gelmeleri ile açıklanmaktadır. (Hou ve ark., 2016; Kurt ve ark., 2019).




**Şekil 2.** RGO örneklerine ait SEM görüntüleri (30.00 K X)

RGO örneklerinin TGA analiz sonuçları Şekil 3' de verilmiştir. Termogravimetri eğrisindeki adımların anlaşılmasını kolaylaştırmak için ise, zamana bağlı kütle değişim hızının izlenebildiği derivatif termogravimetri (DTG) eğrisi de şekillerde kullanılmıştır. RGO örneklerinin Tablo 1'de DTG eğrisinde ki maksimum pik sıcaklıkları ($T_p$), ağırlık kayıpları ve kalıntı miktarları verilmiştir. C-RGO örneğinin TGA termogramın da (Şekil 3) kütle kaybı iki basamakta gerçekleştiği görülmektedir. 100°C' de görülen ilk DTG piki C-RGO örneğinin nem kaybını göstermiştir. 202°C' de görülen en şiddetli DTG piki oksijen içeren fonksiyonel grupların uzaklaşmasına atfedilmiştir (Mindivan, 2016). A-RGO' nun ise tek basamakta termal bozunmaya uğradığı yine Şekil 3' den açıkça görülmektedir. A-RGO örneği ise 136°C' de fonksiyonel grupları kaybederek en büyük ağırlık kaybına uğramıştır. Ayrıca C-RGO örneği 600°C' de %76 kütle kaybıyla, %24 kalıntı bırakarak bozunduğu Tablo 1 ve Şekil 3' den görülmektedir. C-RGO için bu derecede kütle kaybı mükemmel termal kararlılığı yansıtmaktadır (Thakur ve Karak, 2012). Yine aynı Şekil 3 ve Tablo 1' den görüldüğü gibi A-RGO örneği %94 kütle kaybıyla, %6 kalıntı bırakarak termal bozunmaya uğramıştır. C-RGO ve A-RGO örneklerinin en büyük kütle kayıplarının gerçekleştiği sıcaklık değerleri ve % ağırlık kaybı değerleri (Tablo 1) karşılaştırılırsa, C-RGO örneği daha yüksek sıcaklıkta termal bozunmaya ve daha az kütle kaybına uğradığı görülmektedir. Bu durum doğal olarak kalan kül miktarında da artışa neden olmuştur. Termal analiz sonuçları ile C-RGO örneğinin daha yüksek termal kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir.




**Şekil 3.** RGO örneklerine ait TGA ve DTG termogramları

**Tablo 1.** C-RGO ve A-RGO örneklerinin DTG eğrisinde ki maksimum pik sıcaklıkları ($T_p$), ağırlık kayıpları ve kalıntı miktarları

| Örnekler | T (°C) | | | 600 °C' de Ağırlık kaybı (%) | 600 °C' de Kalan Kül Miktarı (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | $T_{P1}$ | $T_{P2}$ | $T_{P3}$ | | |
| **C-RGO** | 100 | 202 | --- | 76 | 24 |
| **A-RGO** | --- | 136 | --- | 94 | 6 |

## SONUÇ

Bu çalışmada hazır temin edilen askorbik asit ve zengin bir askorbik asit kaynağı olan kuşburnu ekstraktı RGO sentezlemek için kullanılmıştır. Sentezlenen RGO örneklerinin yapısal özellikleri ve termal kararlılıkları karşılaştırılmıştır.

- XRD analiz sonucu her iki RGO örneğinin de başarılı şekilde sentezlendiğini göstermiştir. Tabakalar arası mesafenin azalmasından dolayı A-RGO örneğinde grafen tabakalarının yeniden istiflenmesi C-RGO örneğine göre daha fazla olmuştur.

- Her iki örneğin SEM yüzey görüntüleri karşılaştırıldığında, Van der Waals' kuvvetlerinin etkisi A-RGO örneğinin daha buruşuk ve yoğun istiflenmiş katmanlı tabaka yapısı göstermesine neden olmuştur.

- Termal analiz sonuçlarına göre C-RGO örneğinin daha yüksek sıcaklıkta termal bozunmaya ve daha az kütle kaybına uğradığından dolayı A-RGO örneğine göre yüksek termal kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir.

- Termal kararlılığın önemli olduğu durumlarda C-RGO, büyük çapta uygulamalar için A-RGO' nun kullanımı önerilebilir.

**KAYNAKLAR**

Amir Faiz MS, Che Azurahanim CA, Raba'ah SA, Ruzniza MZ 2020. Low Cost and Green Approach in The Reduction of Graphene Oxide (GO) Using Palm Oil Leaves Extract for Potential in Industrial Applications. Results in Physics, 10, 102954.

Cheng H, Lin J, Su Y, Chen D, Zheng X, Zhu H 2020. Green synthesis of soluble graphene in organic solvent via simultaneous functionalization and reduction of graphene oxide with urushiol. Materials Today Communications ,23 :100938.

Dasari BL, Nouri JM, Brabazon D, Naher S 2017. Graphene and derivatives - Synthesis techniques, properties and their energy applications. Energy, 140 : 766-778.

Hou D, Liu Q, Cheng H, Li K, Wang D, Zhang H 2016. Chrysanthemum extract assisted green reduction of graphene oxide. Materials Chemistry and Physics, 183: 76-82.

Hu J, Jia X, Li C, Ma Z, Zhang G, Sheng W, Zhang X, Wei Z 2014. Effect of interfacial interaction between graphene oxide derivatives and poly(vinyl chloride) upon the mechanical properties of their nanocomposites. J Mater Sci, 49:2943–2951.

Ismail Z 2019. Green reduction of graphene oxide by plant extracts: A short review. Ceramics International , 45: 23857–23868.

Kurmarayuni CM, Kurapati S, Akhil S, Chandu B, Khandapu BMK, Koya PR, Bollikolla HB 2020. Synthesis of multifunctional graphene exhibiting excellent sonochemical dye removal activity, green and regioselective reduction of cinnamaldehyde, Materials Letters, 263: 127224

Kurt BZ, Durmus Z, Sevgi E 2019. In Situ Reduction of Graphene Oxide by Different Plant Extracts as a Green Catalyst for Selective Hydrogenation of Nitroarenes. International Journal of Hydrogen Energy, 44:48, 26322-26337.

Lee XJ, Hiew BYZ , Lai KC, Lee LY, Gan S, Thangalazhy-Gopakumar S, Rigby S 2019. Review on graphene and its derivatives: Synthesis methods and potential industrial implementation. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 98:163–180

Mindivan, F 2016. The Synthesis And Characterization Of Graphene Oxide (GO) and Reduced Graphene Oxide (RGO). Machines, Technologies, Materials, 6:201.

Mindivan F, Göktaş M 2019(a). Preparation of new PVC composite using green reduced graphene oxide and its effects in thermal and mechanical properties. Polymer Bulletin,1-21.

Mindivan F, Göktaş M 2019(b)..Effects of various vitamin C amounts on the green synthesis of reduced graphene oxide. Materials Testing, 61:10.

Rattan S, Kumar S, Goswamy JK 2019. Graphene oxide reduction using green chemistry. Materials Today: Proceedings, xxx: xxx 4-5.

Singh V, Joung D, Zhai L, Das S, Khondaker SI, Seal S 2011. Graphene based materials: Past, present and future. Progress in Materials Science, 56:1178–1271.

Stobinski L, Lesiak B, Malolepszy A, Mazurkiewicz M, Mierzwa B, Zemek J, Jiricek P, Bieloshapka I 2014. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 195: 145-154

Tahriri M, Monico MDel, Moghanian A, Tavakkoli Yaraki M, Torres R, Yadegari A,Tayebi L 2019. Graphene and its derivatives: Opportunities and challenges in dentistry. Materials Science & Engineering C ,102:171–185.

Thakur S, Karak N 2012. Green reduction of graphene oxide by aqueous phytoextracts. Carbon 50, 5331 – 5339.

# Fenton Ve Foto-Fenton Yöntemleri İle, Direct Blue 71 Boyasının ,KOİ Ve Renk Gideriminin İncelenmesi

Merve Taşçı[1]*, Eylem Karaca[2]*,Nevzat Beyazıt

*[1-2]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, TÜRKİYE

mrvtsc@gmail.com

## Özet

Fenton prosesi ile gerçekleştirilen arıtım, oksidasyon, nötralizasyon, koagülasyon/flokülasyon ve çökelme olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır. Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyon, $Fe^{+2}$ 'in OH˚ meydana getirmek üzere $H_2O_2$ ile oksidasyonudur . Ayrıca fenton prosesinin etkinliği ultraviole ışınları ile birlikte geliştirilebilmektedir. UV ışığının varlığında gerçekleşen Fenton prosesi, foto-fenton prosesi olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemde OH˚, $Fe^{+2}$ fotolizi ve $Fe^{+2}$ ile $H_2O_2$ reaksiyonuyla oluşmaktadır.Bu çalışma fenton ve foto-fenton oksidasyonu ile direct blue 71 boyasının koi ve renk giderimi üzerine yapılmıştır. Tepkime koşulları için elde edilen optimum parametreler $Fe^{+2}$ de 2ppm, $H_2O_2$ de 50pmm, 60 dakika tepkime süresi, pH 3 ve tepkime sıcaklığı 20-25˚C olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında direct blue 71 boyasının fenton prosesi ile renk giderim verimi % 96,53 olarak koi giderim verimi 45,70 olarak elde edilmiştir.Ayrıca foto-fenton prosesi ile renk giderim verimi % 99,86 olarak koi giderim verimi 82,25 olarak elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar tekstil endüstrisi atıksularının arıtılması, renk giderimi ve deşarj standartlarını sağlamada yaşanan problemlerin aşılması açısından fenton ve foto-fenton proseslerinin etkin bir çözüm olarak önerilebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler**: Fenton, Foto-Fenton, KOİ ve renk giderimi

**Investigation of Direct Blue 71 paint, KOI and color removal by Fenton and Fenton methods**

## Abstract

The treatment performed with the Fenton process consists of four stages: oxidation, neutralization, coagulation/flocculation and deposition. The reaction, known as the Fenton reaction, is the oxidation of Fe+2 with H2O2 to produce OH . In addition, the effectiveness of the fenton process can be improved with ultraviolet rays. The Fenton process, which takes place in the presence of UV light, is called the photo-fenton process. In this method, OH is formed by photolysis of Fe+2 and reaction of FE+2 to H 2O2.This study was conducted on koi and discoloration of direct blue 71 dye by Fenton and photo-fenton oxidation. The optimum parameters obtained for the reaction conditions were Fe+2 de 2pm, H2O2 de 50pmm, 60 Minutes reaction time, pH 3 and reaction temperature 20-25C. Under these conditions, the fenton process of direct blue 71 dye produces 96.53% of the colour output and the koi output is 45.70%.In addition, with the foto-Fenton process, the color removal yield was 99.86% and the koi removal yield was 82.25%. The results of the study show that fenton and photo-fenton processes can be proposed as an effective solution in order to overcome the problems experienced in the treatment, color removal and discharge standards of textile industry wastewater.

**Key words**: Fenton, Foto-Fenton, KOI and color removal

## 1)GİRİŞ

Son yıllarda Türkiye' de sanayinin hızla gelişmesine bağlı olarak tekstil endüstrisinde büyük adımlar atılmaktadır. Tekstil sektörü hayatımızın her alanında ihtiyacımız olan ürünleri kullanımımıza sunarken, yine bizim isteklerimiz doğrultusunda çevre şartlarına dayanıklı ve uzun ömürlü ürünlerin kullanıma sunulmasına çalışmaktadır. Tekstil ürünlerine değişik özellikler kazandırmak amacıyla yapılan işlemler sonucunda bazı organik ve inorganik kirlilik sebebi maddeler atık suya karışmaktadır. İplik veya kumaş gibi ürünlere renk kazandırmak amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda meydana gelen kirlilik, tekstil atık suları içinde en büyük kısma sahiptir. Bu ürünlere renk kazandırmak için geçmişte bitki köklerinden elde edilen boyar maddeler kullanılırken artık günümüzde daha ucuza daha fazla boyama kapasitesine sahip kimyasal yapılı boyar maddeler kullanılmaktadır. Bu boyar maddelerin kimyasal yapıları değiştirilerek renklerinde solmaya ve diğer

çevresel faktörlere dayanıklı (rekalsitrant yapılı) boyar maddeler elde edilmekte ve tekstil sektörü ürünlerinin renklendirilmesinde çoğunlukla bu ve benzeri boyar maddeler kullanılmaktadır (Arslan, 2004).

Boyar maddeler tekstil, boya, kâğıt, baskı ve kozmetik endüstrilerinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Tahmini olarak yılda 280.000 ton ağırlığında çeşitli boyar madde atık sularla birlikte alıcı ortamına deşarj edilmektedir (Maas and Chaudhari, 2005). Tekstil endüstrileri, yaş dokuma süreçlerinde kullanılmak üzere çok büyük miktarlarda su ve kimyasal tüketmektedir. Gerek boyamada gerekse diğer işlemlerde kullanılan bu organik ve inorganik yapılardaki bileşiklerin çeşitliliğine bağlı olarak, ortaya çıkan atık suların özellikleri de farklılık göstermektedir (Kocaer ve Alkan, 2002). Ortaya çıkan bu renkli atık suların yeterli arıtımı yapılmadan alıcı sulara verilmesi sucul ortamlarda yaşayan canlılara ve insanlara doğrudan ve dolaylı olmak üzere kanserojenik, toksik, mutajenik etkileri görülebilir. Bunun yanı sıra bu durum estetik açıdan da çevreye zarar vermektedir (Fernandes et al., 2004; Safarikova et al., 2005).

Boyar maddeler içerdikleri azo bağlarından dolayı parçalanmaya karşı direnç gösterdiklerinden çevrede yüksek oranlarda birikme potansiyeline sahiptirler. Asidik ve bazik şartlar altında kararlı yapı göstermeleri, aerobik parçalanmaya, ısı ve ışığa karşı dayanıklı olmaları boyar maddelerin konvansiyonel arıtma yöntemleriyle arıtılmasını 3 güçleştirmektedir; bu yüzden bazı durumlarda reaktif boyar madde arıtım işleminden %90 gibi yüksek oranda arıtılamadan çıktığı bilinmektedir (Ertuğrul ve Dönmez, 2009).

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1) FENTON PROSESİ

Fenton yöntemi, ilk olarak 1894 yılında Henry John Horstman Fenton tarafından bulunmuştur. 1934'te ise Haber Weiss mekanizmasıyla baskın olan oksitleyici türünün hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikali olduğu anlaşılarak yararları fark edilmiştir.Fenton prosesinin temel prensibi ortamda demir (II) ($Fe^{+2}$) iyonlarıyla hidrojen peroksit ($H_2O_2$)'in tepkimesi sonucu $OH^{\cdot}$ radikallerinin oluşmasıdır. Asidik şartlarda ($2<pH<5$) gerçekleşen reaksiyonlar aşağıdaki gibidir;

$$Fe^{+2}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3}+OH^{\bullet}+OH^{-} \quad (1)$$

Ortamda olan $Fe^{+2}$ ile $OH^{\cdot}$ radikalinin reaksiyonu sonucunda demir, $Fe^{+3}$'e yükseltgenmesi gerçekleşir;

$$Fe^{+2}+OH^{\bullet} \rightarrow Fe^{+3}+OH^{-} \quad (2)$$

Ortamda H2O2 var olduğu süre boyunca, $Fe^{+2}$ ve $Fe^{+3}$ arasında sürekli devam eden bir döngü oluşacaktır ve oluşan $OH^{\cdot}$ radikali organik maddeye saldırıp, kirleticileri CO2 ve H2O gibi son ürünlere kadar parçalamaktadır:

$$RH+OH^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet}+HO_2 \quad (3)$$

$$Org+OH^{\bullet} \rightarrow Org \rightarrow ... \rightarrow CO_2+H_2O \quad (4)$$

Burada üç alternatif reaksiyon gerçekleşebilmektedir bu reaksiyonlar oksidasyon, dimerizasyon ve indirgeme olmaktadır;

$$R^{\bullet}+Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}+R \quad \text{(Oksidasyon)} \quad (5)$$

$$R^{\bullet}+R^{\bullet} \rightarrow R\text{-}R \quad \text{(Dimerizasyon)} \quad (6)$$

$$R^{\bullet}+Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}+RH \quad \text{(Redüksiyon)} \quad (7)$$

(1)-(7) arasındaki reaksiyonlar Fenton reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır. Denklem (1) ve (2)'de oluşmuş olan $Fe^{+3}$ iyonu ise H2O2 ile reaksiyona girerek $OH^{\cdot}$ radikaline göre reaktifliği daha az kabul edilen $HO2\cdot$ radikalini oluşturmaktadır. Bu reaksiyonda Fenton Benzeri oksidasyonu (Haber-Weiss reaksiyonları) olarak adlandırılmaktadır (Eren 2009).

$Fe^{3+}$'ün yapmış olduğu katalitik etki sebebiyle hidroksil ($OH^{\cdot}$ )ve hidroperoksil ($HO2\cdot$) radikali oluşum mekanizmalarıyla H2O2 bozunur:

$Fe^{+3}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{+2}+OOH^{\bullet}+H^{+}$ (8)

$Fe^{+3}H_2O_2 \rightarrow Fe^{+2}+OOH^{\bullet}+H^{+}\ O_2$ (9)

$OH^{\bullet}+H_2O_2 \rightarrow OOH^{\bullet}+H_2O$ (10)

$OH^{\bullet}+OH^{\bullet} \rightarrow H_2O_2$ (11)

## 2.2) FOTO-FENTON PROSESLERİ

Fenton prosesinin UV ışığının varlığında gerçekleşmesi durumu, foto-Fenton prosesi olarak adlandırılmakta ve H2O2, Fe(II) ve UV radyasyonun kombinasyonu olarak bilinmektedir. Geleneksel Fenton veya fotoliz yöntemi ile karşılaştırıldığında daha fazla HO● üretilmesi ve böylece organik kirleticilerin daha fazla oksitlenmesi mümkün olmaktadır (Lau ve ark., 2002; De Morais ve Zamora, 2005). Ayrıca, UV ışığı kaynağı olarak güneş ışığının potansiyel olarak uygulanabilirliği bu sistemin ilgi çekici avantajlarından sayılmaktadır (Pignatello ve ark., 2006). Ultraviyole (UV) bölgesindeki ışınlar oksidan olarak bazı organik maddeler için etkili olabilmektedir ancak tek başına kullanıldığında sınırlı bir oksidasyon gücüne sahiptirler (Primo ve ark., 2008).Genel olarak UV ile oksidasyon yapıldığında bazı metal tuzları katalizör olarak kullanılmaktadır.UV ışınlamasıyla 200 nm'den daha yüksek dalga boyu değerlerinde Fenton reaksiyonunun oksitleyici gücü büyük ölçüde artırılabilmektedir. Foto-Fenton'un temel reaksiyonu Eşitlik 1'de verilmiştir.

$Fe^{+2}+H_2O_2+hv \rightarrow Fe^{+3}+OH^{-}+OH^{-}+OH^{\bullet}$ (1)

Foto-Fenton prosesi ile Fenton prosesinin oksidasyon hızını sınırlayan iki faktör UV ışınlarının etkisi altında daha fazla hidroksil radikalinin üretilmesini sağlayacak forma dönüştürülür (Eşitlik 2.).

a)Fotoliz yoluyla Fe (III)'ün Fe (II)'ye indirgenmesi (Kavita vePalanivelu.2004).

b) $(Fe\text{-}OH)^{+2}+hv \rightarrow Fe^{+2}+OH^{\bullet}$ (2)

c)Ferrik karboksilatların foto-dekarboksilasyonu (Kavita vePalanivelu.2004;Hermosilla ve ark.2009).

$Fe(III)(RHCO_2)^{+2}+hv \rightarrow Fe^{+2}+CO_2+RH^{\bullet}$ (3)

$RH^{\bullet}+O_2 \rightarrow RHO_2^{\bullet} \rightarrow$ son ürünler (4)

Genellikle aynı KOİ ve TOK giderimi verimi elde edebilmek için Fenton prosesinin foto-Fenton prosesine göre daha fazla demir çamuru oluşturduğu bilinmektedir (Hermosilla ve ark.2009). Buna göre, sızıntı suyu arıtımında foto-Fenton uygulamasının en büyük avantajı geleneksel bir Fenton prosesine kıyasla aynı KOİ giderimine ulaşmak için 32 kat daha az demir harcanması ve 25 kat daha az çamur oluşumu olarak belirtilmektedir.Foto-Fenton prosesinin heterojen kataliz uygulamaları da bulunmakta olup %62 KOİ ve %85 renk giderimine ulaşıldığı belirtilmektedir (Sreeja ve Sosamony2016). Homojen foto-Fenton prosesinde ise

KOİ ve boya giderimi sırasıyla %47 ve %82 olarak elde edilmiştir.(Rodriguez-Chueca ve ark.,2016) yaptıkları çalışmada biyolojik ayrışabilirliği düşük ($BOD_5$/COD <0.19) olan kristalize meyve atıksuyunun foto-Fenton prosesi ile UV-A LED lambaları kullanarak artılabilirliğini incelemişlerdir. Optimum koşullarda (>180 dakika), 23.70 ve 85 $W/m^2$ güç yoğunluklarında sırasıyla %45, %64 ve %74 KOİ giderimine ulaşılmıştır.(Zazouli ve ark.,2012) sızıntı suyun Fenton, Fenton benzeri ve foto-Fenton prosesleri ile arıtımında sırasıyla %70, %66 ve %83 KOİ giderim verimlerine ulaşmışlardır.Her artıma teknolojisinde olduğu gibi Foto-fenton prosesin de bazı avantajları ve dezavantajları mevcuttur;

- Ekonomik bir prosestir, çamur oluşumu düşüktür
- Birçok endüstriyel atıksuya uygulanabilir
- Hemen her konsantrasyondaki (ng/L-µg/L) kirletci için etkindir
- Reaksiyonlar hızlı ve çok kısa sürede gerçekleşmektedir
- Çıkış suyunda bulunan Fe+2 ve çökelek formundaki Fe(OH)3 işletme zorluğu ve maliyet oluşturabilmektedir
- Uygun UV lambaları kullanılmadığında proses maliyeti artabilmektedir.(Mohammad ve ark, 2016; Domingues ve ark, 2018; Wang ve Wang, 2018; Wang ve ark, 2019)

## 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1 Atık Su Ve Özellikleri

Deneylerde kullanılan atıksu Direct Blue 71 boyar maddesi ve saf su ile oluşturulan sentetik atıksudur.

### 3.2 Kimyasal Maddeler

Demir(II) sülfat heptahidrat (FeSO4.7H2O) (Merck) UV/Fe+2, Fenton ve foto-Fenton proses deneylerinde kullanılmıştır.

Sodyum hidroksit (NaOH) (Chem Pure) ve sülfürik asit (H2SO4) (Merck) numulerin pH değerini ayarlamak için kullanılmıştır.

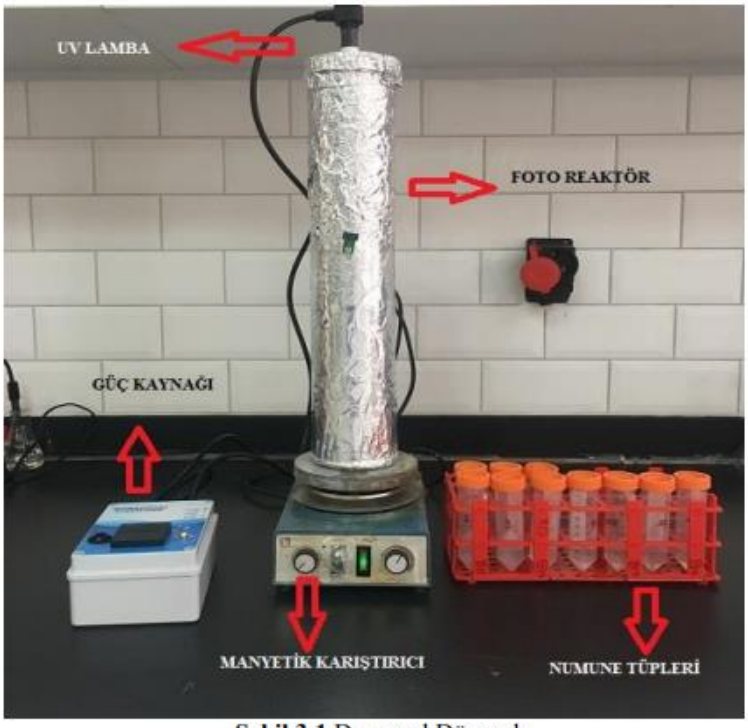
Ağırlıkça %35'lik hidrojen peroksit (H2O2) (Merck) UV/H2O2, Fenton ve foto-Fenton oksidasyon proseslerinde kullanılmıştır.

### 3.3 Cihazlar

Çizelge 3.1 Kullanılan cihazlar ve markaları

| CİHAZ | MARKA |
|---|---|
| Santrifüj | Sigma 3 - 16P |
| pH Metre | HANNA HI 83141 |
| Manyetik Karıştırıcı | IKAMAG RCT |
| Hassas Terazi | Radwag AS 220.R2 |
| Termoreaktör | Spectroquant TR 4220 |
| Spektrofotometre | Spectroquant NOVA 60A |

Bütün deneyler, fotoreaktör cihazında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Fotoreaktör, 7.7 cm iç çapı, 9.02 cm dış çapında ve 48.5 cm yüksekliğinde pleksiglas malzemeden üretilmiş olup 1 adet 16 W şiddetinde UV-C (254nm) düşük-basınçlı civa buhar lambası iç kısımda monte edilmiş durumdadır.




**Şekil 3.1** Deneysel Düzenek

### 3.3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deneysel çalışmaların her aşamasında 2 L atıksu reaktöre doldurulmuştur. pH değeri farklı molarla H2SO4 çözeltisi kullanılarak istenilen değere ayarlanmıştır.

#### 3.3.1 H2O2/Fe+2

Prosesi pH'ı ayarlanan numuneye istenen derişimde FeSO4.7H2O çözeltisi eklenmiştir. H2O2 çözeltisi ilavesiyle Fenton reaksiyonu başlatılmıştır.

#### 3.4.2 H2O2/Fe+2/UV

Prosesi pH'ı ayarlanan numune fotoreaktör cihazına alınarak istenen derişimde FeSO4.7H2O çözeltisi daha sonra H2O2 çözeltisi ilave edilip UV lambası çalıştırılmıştır. Her iki proses deneylerinde numuneler, belirlenen zaman aralıklarında santrifüj tüplerine alınmış, eşzamanlı olarak pH değerleri kaydedilmiştir. Reaksiyon sonlandıktan sonra numuneler 9000 rpm de 10 dk santrifüjlenerek KOİ ve renk ölçümleri yapılmıştır.

### 3.5 ANALİZ YÖNTEMİ

#### 3.5.1 KOİ Analizi

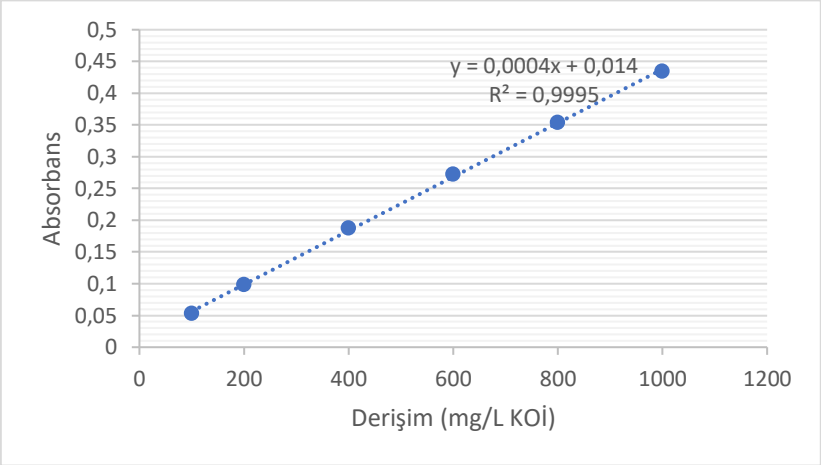
KOİ analizinde, spekrofotometre cihazına uygun Hach Lange LCK 514 marka 13 mm çaplı KOİ test tüpleri kullanılmıştır. Tüplerin içine 1,5 ml potasyum dikromat (K2Cr2O7), 3,5 sülfirik asit (H2SO4) ve 2,5 numune konularak Hach Lange LT 200 marka termoreaktörde 148oC'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede ölçümleri yapılarak KOİ giderim verimi hesaplanmıştır. KOİ giderim verimi;

$$KOİ\ Giderim\ Verimi\ (\%) = (C_0 - C)/C_0 \times 100 \qquad (1)$$

denklemi (1) kullanılarak hesaplanmıştır.

KOİ'si bilinmeyen numunenin KOİ değerini bulabilmek için, Potasyum Hidrojen Ftalat (KHP) (HOOCC6H4COOK) Stok KOİ Çözeltisinin 0, 100, 200, 400, 800, 1000 mg/L'lik derişimlerine karşılık

absorbans değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen eğri yardımıyla y = 0,0003x + 0,0342 denkleminde yerine koyularak KOİ konsantrasyonu belirlenmiştir.




Şekil 3.2 Kalibrasyon grafiği

### 3.5.2 Renk Analizi

Renk analiz sonuçları Pt-Co birimi ile, 587 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Renk giderim verimi denklem (2) kullanılarak hesaplanmıştır.

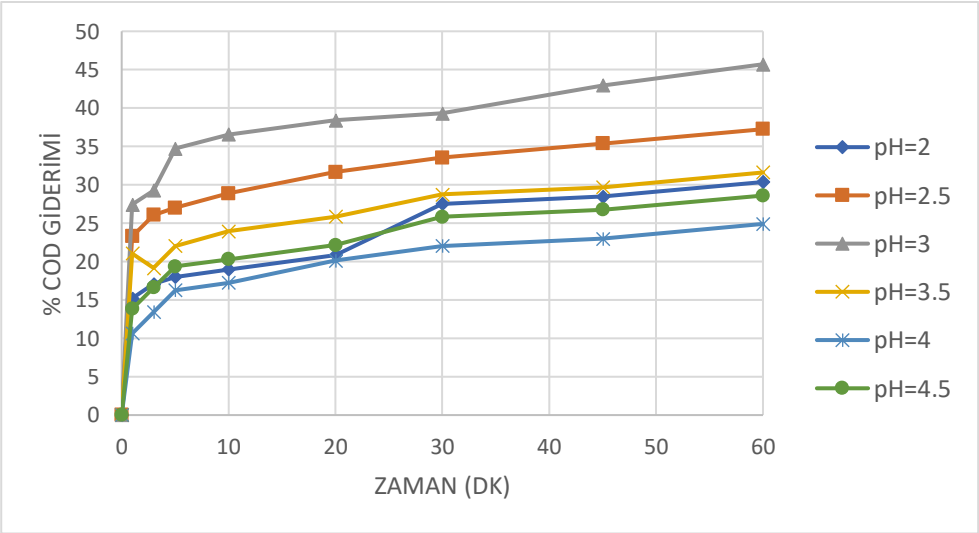
Renk Giderim Verimi (%) = $(C_0 - C)/ C_0 \times 100$ (2)

## 4)BULGULAR VE TARTIŞMA

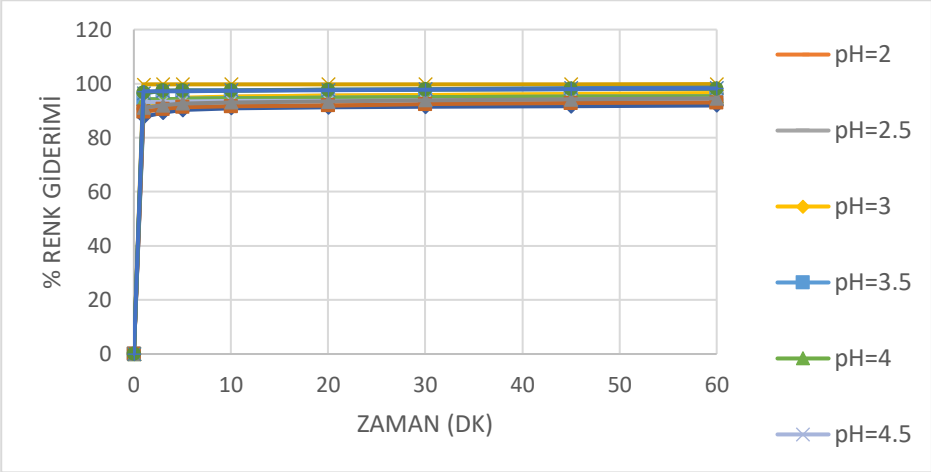
### 4.1 $H_2O_2$/Fe+2 Prosesi

### -pH Etkisi

pH etkisi incelemelerinde istenilen pH aralığına getirmek için $H_2SO_4$ veya NaOH kullanılmıştır. Hacimsel değişikliklerden kaçınmak için minimum miktarda asit ve baz eklemek için değişik derişimlerde asit ve baz seçilmiştir. pH; 2-2,5-3-3,5-4-4,5 değerleri kullanılarak zamana karşı giderim verimi incelenmiş, elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.




**Şekil 4.1**:Atık suyun KOİ giderim veriminin pH ile değişimi ($H_2O_2$=50 mM, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 60dk)

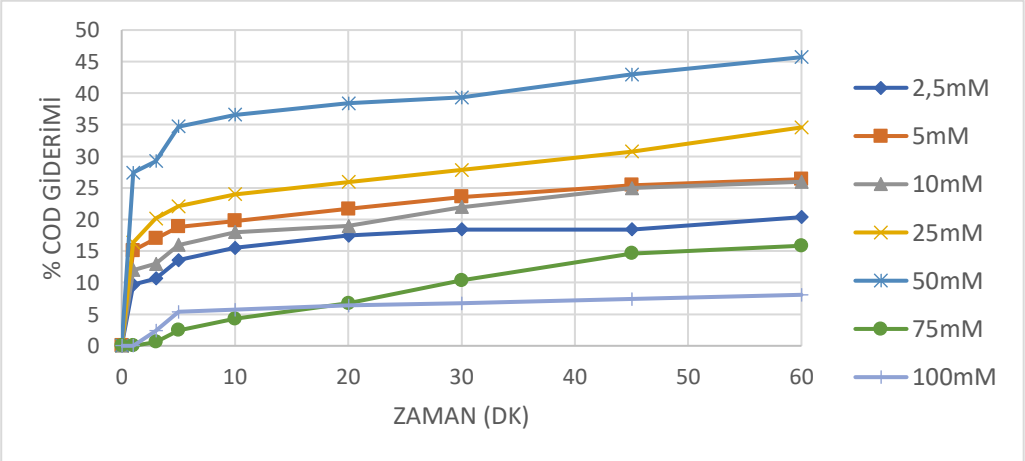



**Şekil 4.2** Atık suyun renk giderim veriminin pH ile değişimi (H2O2=50 mM, Fe+2=2 mM, reaksiyon süresi 60dk)

Fenton prosesinde redoks reaksiyonları asidik koşullarda daha verimlidir. Bu da renk giderimi ve KOİ açısından önemlidir.Bazik koşullarda ise Fenton prosesinin veriminin düştüğü gözlemlenmektedir. Bu durumun sebebi $Fe^{+2}$ iyonunun $Fe^{+3}$ kolloidlerine dönüşmesi ve katalitik etkinliğinin kaybedilmesidir.pH= 3.5'tan az olduğunda hidrojen peroksit (H2O2) ve demir (II) ($Fe^{+2}$) daha kararlı olmaktadır. pH=4'ten fazla olduğunda ise daha kararsız olup, kolaylıkla demir hidrokso kompleksleri üretmek için daha yatkın olan demir iyonlarını oluşturmuş olurlar. FeSO4 ortama ilave edildiğinde ise pH düşer. Bunun nedeni içinde serbest bir durumda H2SO4 olmasıdır.Hidrojen peroksitin eklenmesiyle pH daha da düşer. Bu nedenle pH sürekli kontrol edilmeli ve reaksiyon istenilen değerlerde yürütülmelidir.Eğer pH düzeyinde bir düşme olmuyorsa H2O2'nin reaksiyonu inhibe eden tepkimelere yatkın olduğu söylenebilir (Duman 2006).pH; 2, 2,5, 3, 3,5, 4 ve 4,5 değerleri kullanılarak zamana karşı giderim verimi incelenmiştir. $H_2O_2$ ve $Fe^{+2}$ değerleri sabit tutulmuştur.Yüksek pH değerlerinde $H_2O_2$ ve demirin kararsız olmasından dolayı boyar maddelerin renk giderim verimleri düşmektedir.

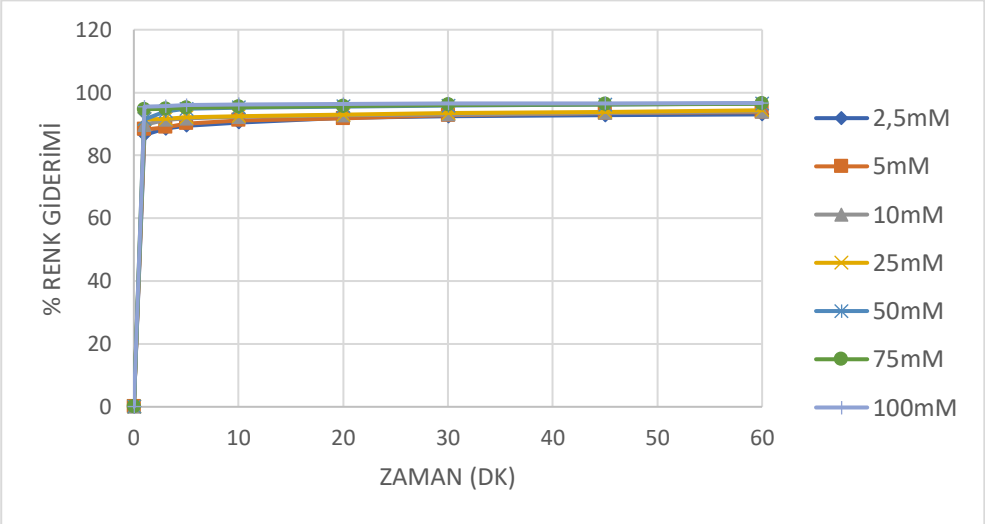
**- H2O2 Derişimi Etkisi**

Kirlilik yükü fazla olan atık sularda başlangıçta demir ve H2O2 miktarının fazla tutulması reaksiyonların performansını olumlu etkilemektedir.H2O2 yüksek miktarda kullanıldığı zaman renk giderim verimi de yüksek olmaktadır. Fakat bu durumun etkisi belli bir yere kadar olumluyken bir noktadan sonra fazla hidrojen peroksit $OH^{\cdot}$ radikalleriyle reaksiyona girer ve oksidasyon veriminin düşmesine sebep olur (Bouasla e*t all* 2010).




**Şekil 4.3** Atık suyun KOİ giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 60dk)

Belirli bir $H_2O_2$ konsantrasyon aralığında yapılan deneylerde;Fenton prosesi için en yüksek verim 50 mM derişim değerinde %45,70 COD giderimine ulaşılmıştır.

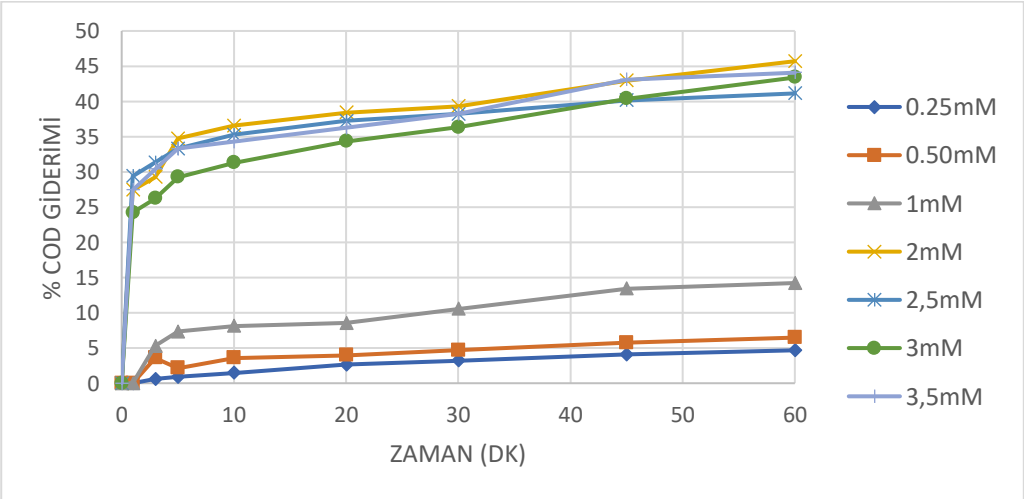



**Şekil 4.4** Atık suyun renk giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, Fe+2=2 mM, reaksiyon süresi 60dk)

Fenton prosesi için en yüksek verim 50 mM derişim değerinde % 96,53 renk giderimine ulaşılmıştır.

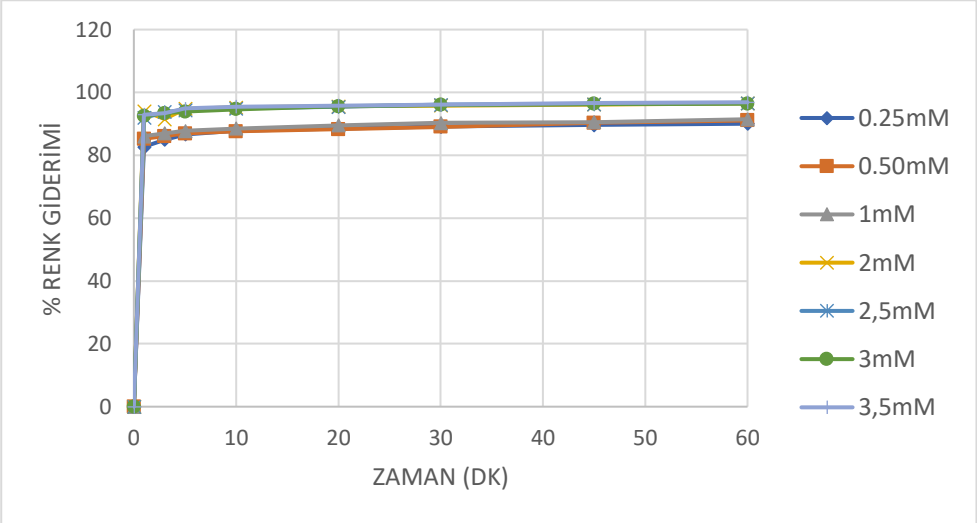
**- Fe+2 Derişimi Etkisi**

Fenton prosesinde ortamda demir iyonu olmadığında $OH^{\cdot}$ radikallerinin üretimi gerçekleşmez ve oksidasyon olayından söz edilemez. Ortamda bulunan demir konsantrasyonunun fazla olması belli bir değere kadar reaksiyon hızını arttırmaktadır. Bu noktada optimum demir konsantrasyon dozunun ayarlanması gerekir.




**Şekil 4.5** Atık suyun KOİ giderim veriminin Fe+2derişimi ile değişimi (pH=3, $H_2O_2$= 50 mM, reaksiyon süresi 60dk)

En uygun pH ve $H_2O_2$ derişiminde yapılan deney sonuçlarına göre fenton prosesinde 2 mM demir iyonu derişiminde % 45,70 COD giderim verimi gözlemlenmiştir.



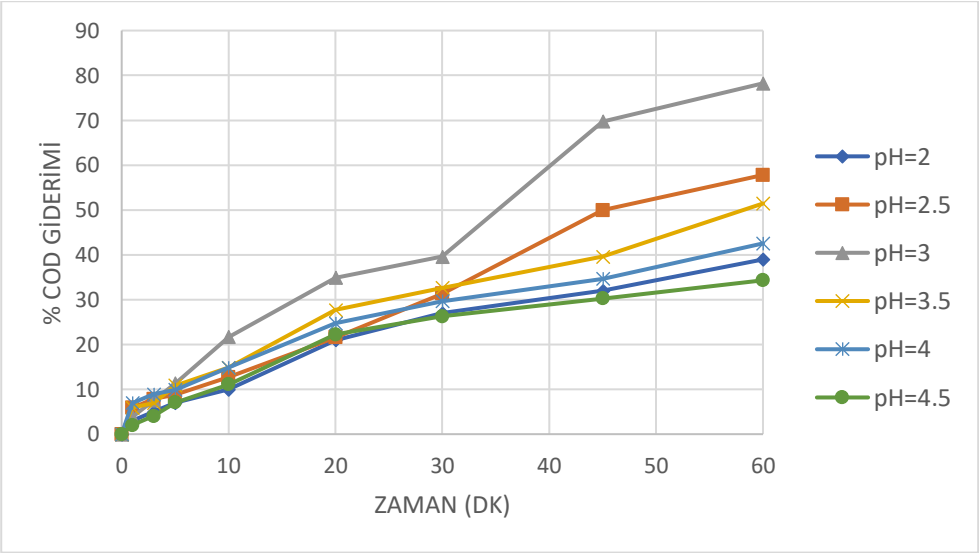

**Şekil 4.6** Atık suyun renk giderim veriminin Fe+2derişimi ile değişimi (pH=3, H2O2= 50 mM, reaksiyon süresi 60dk)

Fenton prosesi için en yüksek verim 2mM derişim değerinde % 96,53 renk giderimine ulaşılmıştır.

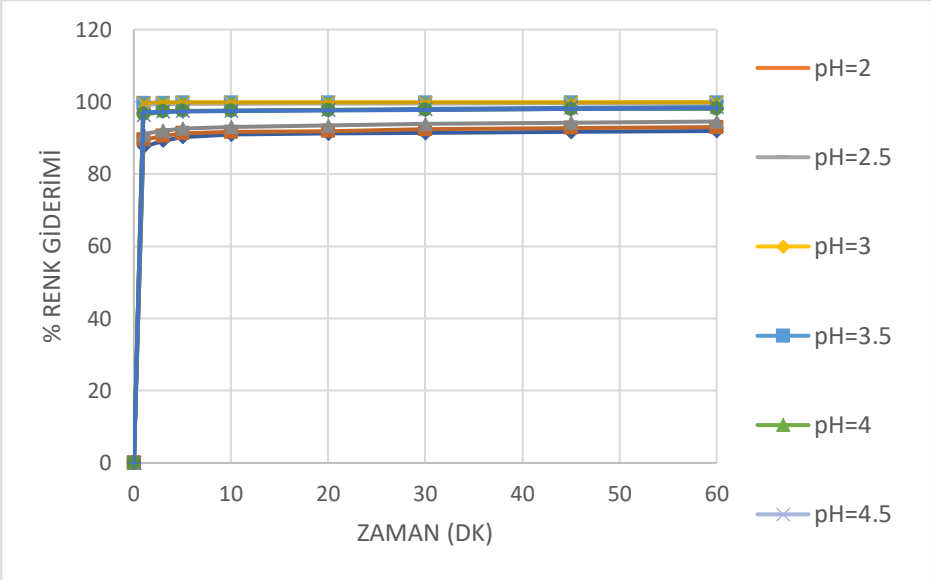
### 4.2 H2O2/Fe+2/UV Prosesi

**- pH Etkisi**

Yüksek pH değerlerinde $H_2O_2$ ve demirin kararsız olmasından dolayı boyar maddelerin renk giderim verimleri düşmektedir. Bu sebepten dolayı pH aralığı 2-4,5 arası tutulmuş olup, pH değerlerinin KOİ ve renk giderimi üzerinde etkisi incelenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.




**Şekil 4.7** Atık suyun KOİ giderim veriminin pH ile değişimi (H2O2=50 mM, Fe+2=2 mM, reaksiyon süresi 60dk)

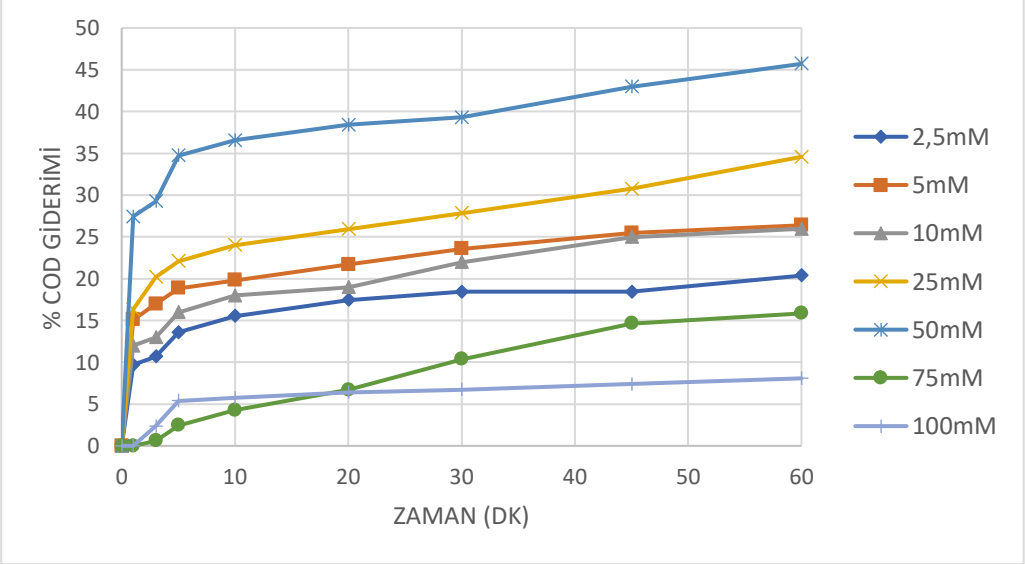



**Şekil 4.8** Atık suyun renk giderim veriminin pH ile değişimi ($H_2O_2$=50 mM, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 60dk)

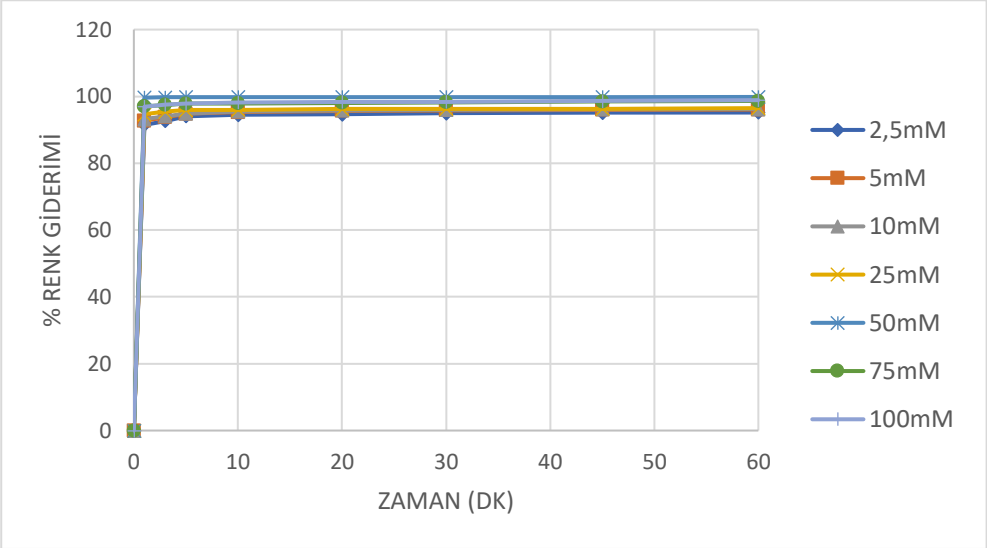
Foto-Fenton prosesi, Fenton prosesine göre, daha fazla hidroksil radikali ürettiğinden oksidasyon daha hızlıdır.

**- H2O2 Derişimi Etkisi**

En uygun belirlenen pH değerinden sonra en uygun hidrojen peroksit miktarını belirlemek için 2,5-5-10- 25-50-75 ve 100 mM derişimlerinde hidrojen peroksit denemeleri yapılmıştır. Yapılan deneyler bir önceki aşamada bulunan en iyi pH(3) değerinde gerçekleştirilmiş, demir derişimi sabit tutulmuştur.




**Şekil 4.9** Atık suyun KOİ giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 60dk)

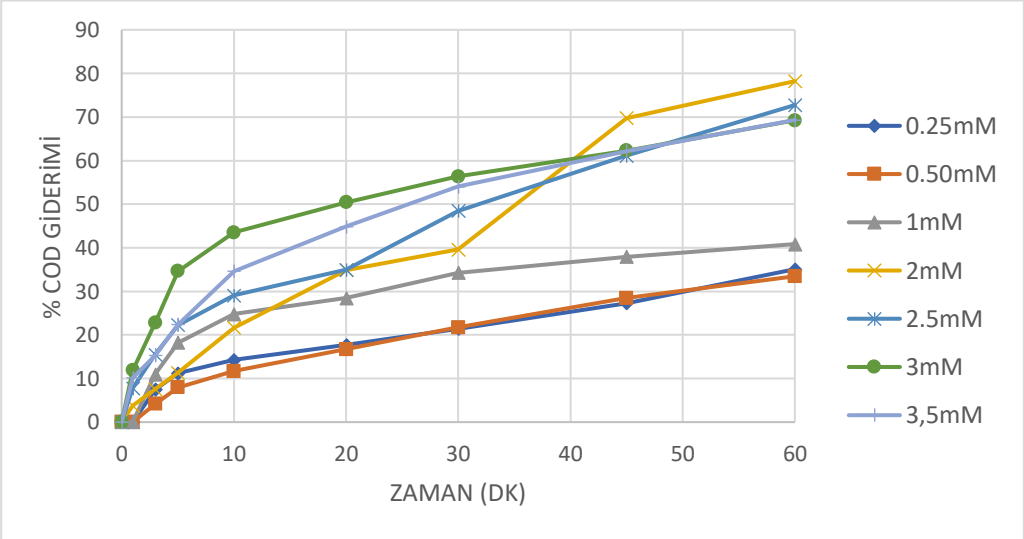



**Şekil 4.10** Atık suyun renk giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 60dk)

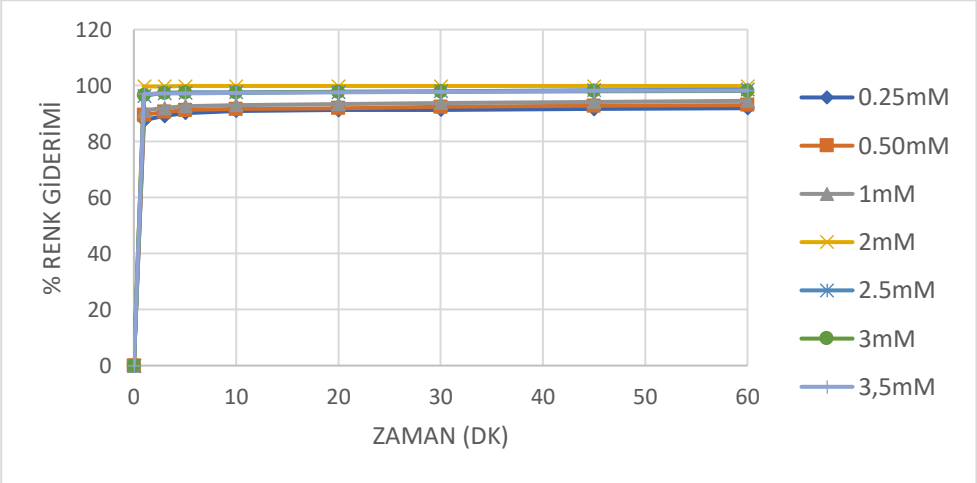
Başlangıçtaki $H_2O_2$ miktarı arttıkça, ilave üretilen OH● radikalleri nedeni ile kirletici degradasyon verimi de artmaktadır. Ancak optimum miktardan daha fazla ortamda bulunan $H_2O_2$, OH● radikalleri ile reaksiyona girerek çok daha düşük oksidasyon potansiyeline sahip olan HO2• radikallerinin oluşmasına neden olur. Ortamda optimum miktardan daha az $H_2O_2$ olması durumunda ise daha az miktarda OH● radikali oluşmasından dolayı oksidasyon verimi ve mineralizasyon derecesi düşük olur (Solmaz ve ark. 2010). Foto-Fenton prosesi, UV ışınının etkisi ile Fenton prosesine göre daha fazla hidroksil radikalleri oluşturur.

**-$Fe^{+2}$ Derişimi Etkisi**

Uygun pH değeri ve $H_2O_2$ derişimi belirlendikten sonra demir iyonu derişiminin renk ve KOİ üzerine etkisi incelenmiştir. Demir iyonu derişimi 0,25-3,5 mM aralığında tutulmuştur. Sonuçlara dair grafikler aşağıda verilmiştir.




**Şekil 4.11** Atık suyun KOİ giderim veriminin $Fe^{+2}$derişimi ile değişimi (pH=3, $H_2O_2$= 50 mM, reaksiyon süresi 60dk)




**Şekil 4.12** Atık suyun renk giderim veriminin $Fe^{+2}$derişimi ile değişimi (pH=3, $H_2O_2$= 50 mM, reaksiyon süresi 60 dk)

Deneylerde kullanılan Demir(II) sülfat heptahidrat ($FeSO_4.7H_2O$) oda koşullarında mavi yeşil mono klinik kristaller halinde bulunur. Demir iyonları, $H_2O_2$ üzerinde katalitik ayrıştırma etkisine sahiptir. Optimum pH ve $H_2O_2$ derişiminde yapılan deney sonuçları Şekil 4.11 ve 4.12 de gösterilmiştir. Artan demir iyonu derişimi kirlilik giderim verimini de arttırmıştır.

## 5.SONUÇLAR

Yapılan çalışmada, direct blue 71 fenton ve foto-fenton proseslerin performansı araştırılmıştır. Proses verimleri KOİ ve Renk parametreleri açısından değerlendirilmiştir.Fenton ve foto-fenton proses çalışmalarında en etkin arıtım oranları 2mM $Fe^{+2}$/L ve 50mM $H_2O_2$ konsantrasyonlarında ve pH 3' de gerçekleşmiştir. Fenton prosesinde gerçekleşen KOİ ve Renk giderim oranları sırasıyla %45, %96 olarak tespit edilmiştir. Foto-fenton prosesinde gerçekleşen KOİ ve Renk giderim oranları sırasıyla %45, %96 olarak tespit edilmiştir. Fenton proses arıtım performansının pH 2-3 aralığında yükselirken, pH 3' ün üzerinde düşüşe geçtiği belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, sentetik atıksuyun arıtılmasında fenton ve foto-fenton proseslerinin oldukça etkili oldukları ortaya koymuştur.

## KAYNAKLAR

Bouasla, C., Samar M. E.H. and Ismail F., 2010. Degradation of Methyl Violet 6b Dye by the Fenton Process, Desalination, (254), 35-41.

C. Flox, J.A. Garrido, R.M. Rodriguez, P.L. Cabot, F. Centellas, C. Arias, E. Brillas, Mineralization of herbicide mecoprop by photoelectro-Fenton with UVA and solar light, Catal. Today 129 (2007) 29–36

Eren, Z., 2009. İleri Oksidasyon Prosesleri İle Tekstil Boyar Maddelerinin ve Tekstil Atıksularının Arıtılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum.

Duman, E., 2006. İlaç Endüstrisi Atıksularının Fenton Oksidasyonu İle Arıtılabilirliğinin Araştırılması. Y.Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.

Hermosilla, D., Cortijo, M. ve Huang, C. P., 2009, Optimizing the treatment of landfill leachate by conventional Fenton and photo-Fenton processes, Science of the total environment, 407 (11), 3473-3481.

Kavitha, V. ve Palanivelu, K., 2004, The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton processes for the degradation of phenol, Chemosphere, 55 (9), 1235-1243.

Kocaer, F.O. ve Alkan, F., 2002. Boyar madde içeren tekstil atıksularının arıtım Alternatifleri. Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 1 (7), 47-55.

Lau, I. W., Wang, P., Chiu, S. S. ve Fang, H. H., 2002, Photoassisted Fenton oxidation of refractory organics in UASB-pretreated leachate, Journal of Environmental Sciences, 14 (3), 388-392.

Mohammad-pajooh, E., Turcios, A. E., Cuff, G., Weichgrebe, D., Rosenwinkel, K.-H., Vedenyapina, M. ve Sharifullina, L., 2018, Removal of inert COD and trace metals from stabilized landfill leachate by granular activated carbon (GAC) adsorption, Journal of environmental management, 228, 189-196.

J.J. Pignatello, E. Oliveros, A. Mackay, Advanced oxidation processes for organiccontaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry,Crit. Rev. Environ. Sci. Tech. 36 (2006) 1–84.

Pignatello, J. J., Oliveros, E. ve MacKay, A., 2006, Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry, Critical reviews in environmental science and technology, 36 (1), 1-84.

Primo, O., Rivero, M. J. ve Ortiz, I., 2008, Photo-Fenton process as an efficient alternative to the treatment of landfill leachates, Journal of hazardous materials, 153 (1-2), 834-842.

Sreeja, P. ve Sosamony, K., 2016, A comparative study of homogeneous and heterogeneous photo-Fenton process for textile wastewater treatment, Procedia Technology, 24, 217-223.

Solmaz ve ark. 2010 Solmaz S K A, Azak H, Üstün G E., Morsünbül T (2010). Pestisit Gideriminde Fenton Proseslerinin Kullanımına Yönelik Bir Envanter Çalışması. Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt 15.

Zazouli, M. A., Yousefi, Z., Eslami, A. ve Ardebilian, M. B., 2012, Municipal solid waste landfill leachate treatment by fenton, photo-fenton and fenton-like processes: Effect of some variables, Iranian journal of environmental health science & engineering, 9 (1), 3.

# Direct Yellow 86 Tekstil Boyar Maddesinin Sulu Çözeltilerinden Renk ve KOİ Gideriminde İleri Oksidasyon Proseslerinin Verimliliğinin İncelenmesi

Eylem KARACA,Merve TAŞÇI[1*], Nevzat BEYAZIT[2]

[*1]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, TÜRKİYE
[2]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, TÜRKİYE

[*]eylem645@hotmail.com

## Özet

Bu çalışmada tekstil boyar maddesi olan Direct Yellow 86 boyasının sulu çözeltilerinden ileri oksidasyon prosesleri kullanılarak renk ve KOİ giderim verimleri araştırılmıştır. Bu çalışma ile fenton ve foto fenton benzeri prosesleri için farklı pH değerleri, $H_20_2$ ve $Fe^{+2}$ konsantrasyonları denenerek proses performansı üzerine etkisinin belirlenmesi için en uygun deneysel koşulların seçilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı $H_20_2$( 5-10-25-50-60-75-90-100 mM) ve $Fe^{+2}$ (0,5-1-2-2,5-3-3,5 mM) konsantrasyonlarında ve pH=2-4,5 arasında deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Tepkime koşulları için elde edilen optimum parametreler $H_20_2$ konsantasyonu 50 pmm, $Fe^{+2}$ konsantrasyonu 2,5 ppm, pH 3 ve tepkime sıcaklığı 20-25˚C olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında direct yellow 86 boyasının fenton prosesi ile KOİ giderim verimi % 38,57 olarak renk giderim verimi 95,85 olarak elde edilmiştir. Ayrıca foto-fenton prosesi ile KOİ giderim verimi % 90,90olarak renk giderim verimi 98,01 olarak elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar tekstil endüstrisi atıksularının arıtılması, renk giderimi ve deşarj standartlarını sağlamada yaşanan problemlerin aşılması açısından fenton ve foto-fenton proseslerinin etkin bir çözüm olarak önerilebileceğini göstermektedir.

.

**Anahtar Kelimeler:** Fenton, foto-Fenton, KOİ ve renk giderimi, tekstil boyar maddesi, UV

## Direct Yellow 86 investigation of the efficiency of advanced oxidation processes in color and COD removal from aqueous solutions of Textile Dyes

## Abstract

In this study, color and koi removal yields were investigated using advanced oxidation processes from aqueous solutions of Direct Yellow 86 dye, which is a textile dyestuff. In this study, it was aimed to select the most appropriate experimental conditions for fenton and photo Fenton-like processes by testing different pH values, $H_20_2$ and $Fe^{+2}$ concentrations to determine their effect on process performance. $H_20_2$( 5-10-25-50-60-75-90-100 mM) and $Fe^{+2}$ (0,5-1-2-2,5-3-3,5 mM) concentrations and pH=2-4,5 experimental studies were conducted. The optimum parameters for the reaction conditions were $H_20_2$ concentration 50 pmm, $Fe^{+2}$ concentration 2.5 ppm, pH 3 and reaction temperature 20-25C. Under these conditions, with the fenton process of direct yellow 86 dye, COD getter yield is 38.57% and color getter yield is 95.85%. In addition, with the foto-Fenton process, COD removal efficiency is 90.90% and color removal efficiency is 98.01. The results of the study show that fenton and photo-fenton processes can be proposed as an effective solution in order to overcome the problems experienced in the treatment, color removal and discharge standards of textile industry wastewater.

**Keywords:** Fenton, photo-Fenton, COD and color removal, textile industry wastewater, UV

## 1.GİRİŞ

Endüstrinin hızla gelişmesi ve kentleşme sonucu temiz su ihtiyacı ve çevre kirliliği gibi sorunlar ortaya çıkmaya başlamıştır. Yeryüzündeki suyun kirlenmesi, işlenmemiş ve/veya kısmen işlenmiş endüstriyel atıksuyun kontrolsüz bir şekilde boşaltılmasından kaynaklanmaktadır (Pouran vd., 2015). Dünya genelinde ve ülkemizde boyarmadde kullanım alanlarına bağlı olarak gereksinim her geçen gün artmaktadır. Yün, pamuk, ipek vb. boyanması için kullanılan sentetik boyarmaddelerin %80'i tekstil sanayinde olmak üzere çok geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır.Tekstil sanayinden sonra plastik, deri, gıda, ilaç, otomotiv, makine, inşaat,

cam ve porselen sanayi, matbaacılık ve güzel sanatlar gibi alanlarda sentetik boyarmaddelerin kullanıldığı bilinmektedir.(Ustabaş.,2016)
Tekstil endüstrisinde kullanılan boyar madde ve pigmentlerin uygulamalar esnasında oluşan kayıplar sonucunda yaklaşık %10-15'inin alıcı ortama verildiği ön görülmektedir (Dizge ve ark., 2008). Bu doğrultuda boyar madde içeriğine sahip atık sularının renk giderimini gerçekleştirecek prosesler ekolojik olarak oldukça önem taşımaktadır.
Atıksu arıtımında biyolojik arıtım, fiziksel ve fiziko-kimyasal arıtım gibi klasik atıksu arıtım teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin atıksudaki organik kirleticileri gidermede yetersiz kaldığı rapor edilmiştir (Bethi vd., 2016). Organik bileşikler, toprak ve sudaki mikrobiyolojik bozunmaya karşı çeşitli derecelerde dirençli kimyasallardır (Pouran vd., 2015). Bu organik bileşikler, insan sağlığı üzerinde ciddi bir tehlike arz ederler. Bunların çoğu kanserojenik ve toksiktir. Bazı organik kirleticiler, çok daha düşük derişimlerde bile toksik ve zararlı olarak kabul edilmektedir (Babuponnusami ve Muthukumar, 2014).
Bu sebeplerden dolayı atıksulardaki organik kirleticilerin uzaklaştırılması büyük bir önem taşımaktadır. Atıksulardaki organik bileşikleri gidermek için geleneksel yöntemler yetersiz kaldığından, ileri oksidasyon prosesleri (AOP), son yıllarda tercih edilen alternatif arıtım yöntemlerinden biri haline gelmiştir. İleri oksidasyon prosesleri hidroksil radikallerinin üretimi nedeniyle çok yönlü teknolojiler olarak adlandırılırlar. Ayrıca organik kirleticilerin bozunması sırasında daha az toksik ara ürün üretir ve klasik arıtma tekniklerine göre daha verimlidirler (Bethi vd., 2016). Bununla birlikte, hidroksil radikalleri ile organik bileşikler arasındaki reaksiyon süreleri biyolojik arıtma proseslerine göre daha düşüktür ve böylece kirleticilerin uzaklaştırılması daha kısa sürede gerçekleştirilir.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 FENTON PROSESİ ($H_2O_2/Fe^{+2}$)

İleri Oksidasyon yöntemlerinden biri olan Fenton prosesi ($Fe^{+2}/H_2O_2$) kirlilik yükü fazla ve oldukça renkli olan atıksulara uygulanabilmektedir. Proses işletme kolaylığı ve işletme maliyetinin ucuz olmasından dolayı tercih edilmektedir (Arslan ve ark. 2001, Arslan-Alaton 2003). Fenton oksidasyon prosesinde organik maddeler $FeSO_4$ varlığında $H_2O_2$ ile reaksiyona girerek atıksu içerisindeki KOI ve toksisiteyi azaltmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu Fenton oksidasyonunun mekanizması bulunmuş ve asidik şartlar altında $H_2O_2$'ten katalitik dekompozisyonla hidroksil radikallerinin $OH^{\bullet}$ oluştuğu görülmüştür (Harber ve Weiss 1934, Barb ve ark. 1951).

Asidik koşullar altında hidroksil radikalleri $OH^{\bullet}$ oluşturan homojen bir katalitik oksidasyon işlemidir (Türeli, 2008). Hidrojen peroksitin ayrışması için demir tuzları bir katalizör görevi görür ve hidroksil radikali üretirler (Rahmani, 2017). Fenton prosesi reaksiyon adımları aşağıdaki denklemlerde görülmektedir (Nikravan, 2015).

$$Fe(II) + H_2O_2 \longrightarrow Fe(III) + OH^{\bullet} + OH^- \quad (1)$$

$$OH^{\bullet} + Fe(II) \longrightarrow OH^- + Fe(III) \quad (2)$$

$$Fe(III) + H_2O_2 \longleftrightarrow Fe\text{-}OOH^{+2} + H^+ \quad (3)$$

$$Fe\text{-}OOH^{+2} \longleftrightarrow HO_2 + Fe(II) \quad (4)$$

$$Fe(II) + HO_2 \longrightarrow Fe(II) + O_2 + H^+ \quad (5)$$

$$OH + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + HO_2 \quad (6)$$

Fenton işlemi pH 2-5 aralığında etkilidir ve genellikle pH 2.8-3.0'de en etkili verimlere ulaşılmaktadır (Pignatello 1992). Çok düşük pH değerlerinde, oluşan $[Fe(H_2O)]^{+2}$, hidrojen peroksit ile daha yavaş reaksiyona girerek daha az $OH^{\bullet}$ oluşturur ve düşük pH değerleri, $Fe^{+3}$ ve $H_2O_2$ arasındaki reaksiyonu engelleyebilmektedir (Deng ve Englehardt, 2006).
Ayrıca düşük pH değerlerinde hidrojen peroksit oluşumunu azaltan hidrojen gazının ortaya çıkmaktadır. Bu durum giderim verimini düşürmektedir. pH 2'nin altında, Fenton reaksiyon hızında bir düşüş meydana getiren $Fe^{+2}$ ile daha az reaktif olan peroksiyum iyonu ($H_3O_2^+$) ve kompleks demir türlerinin oluşumu vardır. pH 4 ten

yüksek değerlerde ise ferrik hidroksitin ($Fe(OH)_3$) çökelmesi meydana gelir (Zhou vd., 2018;Baiju vd., 2018). pH 4'ün üzerinde $H_2O_2$, oksidasyon reaksiyonlarına herhangi bir katkı yapmadan farklı bir şekilde ayrışır. Alkali koşullar altında $H_2O_2$ herhangi bir hidroksil radikali üretmez (Umar vd., 2010). Sonuç olarak fenton prosesleri; oksidan olarak hidroksil radikallerinin üretimi ve atıksudaki organik kirleticilerin oksidanlarla olan reaksiyonlarından oluşur (Oturan ve Aaron, 2014). Bu ileri oksidasyon prosesinde, $H_2O_2$'nin oksidan olarak kullanılması, nispeten ucuz, bol ve suda çözünür olması avantajına sahiptir.

## 2.2 FOTO-FENTON PROSESİ ($H_2O_2/Fe^{+2}/UV$)

Fenton'un UV ışığıyla (180–400 nm) tepkimesi, yani genel olarak adlandırılan Foto-Fenton işlemi, daha fazla $OH^\bullet$ üreterek tepkimeyi arttırır. Bununla birlikte, toplam demir kullanımı azaldığından reaksiyon sonunda çamur oluşumu da azalmaktadır (Pouran vd., 2015).

$$Fe(OH)^{+2} + h\nu \longrightarrow Fe(II) + OH^\bullet \qquad \nu<580nm \qquad (7)$$

$$H_2O_2 + h\nu \longrightarrow 2\ OH^\bullet \qquad \nu<310nm \qquad (8)$$

Fenton reaksiyonunda (karanlıkta) $Fe^{+2}$ nin $Fe^{+3}$ e tam dönüşmesinden sonra radikal üretimi yavaşlar. UV varlığında ise, $Fe^{+3}$ fotolitik olarak kullanılarak yeniden $Fe^{+2}$ iyonlarını oluşturarak ortamda daha fazla radikal oluşturmak mümkündür.

$$H_2O + Fe^{+3} + h\nu \longrightarrow Fe^{+2} + H^+ + OH^\bullet \qquad (9)$$

Homojen ileri oksidasyon prosesleri;
- -Ortam basıncı ve sıcaklığında çalıştırma,
- - Demir tuzu ve hidrojen peroksitin ucuz kimyasallar olması,
- - Kütle transferi kısıtlamaları bulunmaması,
- - Geniş bir organik bileşik yelpazesinde ayrışma sağlaması,
- -Toksik olmaması,

gibi önemli avantajlara sahiptir (Nikravan, 2015; Rahmani, 2017).

## 2.3 ELEKTRO-FENTON PROSESİ

Elektro-Fenton prosesi son yıllarda önem kazanmaya başlamış, özellikle boyar maddeler gibi kirleticilerin giderilmesinde önemli role sahip bir elektrokimyasal ileri yükseltgenme tekniğidir. Elektro-Fenton yönteminde, Fenton prosesinde dışarıdan ilave edilen $H_2O_2$, $Fe^{+2}$ veya bunların her ikisi de tepkime ortamında üretilmektedir. Temel prensip olarak hava ya da $O_2$ ile beslenmekte olan uygun bir katot yüzeyinde $H_2O_2$' in oluşturulmasıyla katalitik ölçüde Fe varlığında çözelti içerisinde $OH^\bullet$ radikallerinin oluşturulması esas alınmaktadır. Eş zamanlı olacak şekilde katodun yüzeyinde $O_2$'nin indirgenmesi ile $H_2O_2$, $Fe^{+3}$'ün indirgenmesi ile de $Fe^{+2}$ oluşturulmaktadır. Ortamda oluşturulan $Fe^{+2}$ ile $H_2O_2$'nin tepkimeye girmesi sonucu olarak ise hidroksil radikalleri oluşur. Biyolojik olarak ayrışmaya dirençli ve toksik organik kirletici maddeler $OH^\bullet$ radikalleriyle reaksiyona girerek parçalanır.

Elektro-Fenton uygulamalarında $Fe^{+2}$ ve $H_2O_2$'nin elde edilebilmesi için litaratürde dört farklı yöntem vardır. Bu yöntemlere göre; birinci teknikte, $Fe^{+2}$ kullanılan demir anot aracılığıyla anotta üretilir, ilave olarak ise elektrolitik hücre tasarımına göre katotta $Fe^{+2}$ sürekli olarak yeniden üretilebilirken, $H_2O_2$ ise ortama dışarıdan ilave edilir. İkinci teknikte, hem $Fe^{+2}$ hem de $H_2O_2$ ortama dışarıdan ilave edilir. Fakat $Fe^{+2}$ katotta sürekli yeniden üretilir. Üçüncü teknik olarak, $Fe^{+2}$ ve $H_2O_2$ eş zamanlı şekilde reaktörün içinde elektrolitik olarak üretilmektedir. Bu teknikte $Fe^{+2}$ kaynağı olarak demir anot kullanılır iken $H_2O_2$ kaynağı olarakta katotun yüzeyine $O_2$ gönderilerek elde edilir. Dördüncü ve son tekniğe göre ise, $Fe^{+2}$ demir elektrot vasıtasıyla anotta üretilir iken $H_2O_2$'de katotta üretilmektedir (Bayar 2014).

Bu çalışmada, direct yellow 86 tekstil boyar maddesi ile oluşturulan sentetik atık sudan renk ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) gideriminde ileri oksidasyon proseslerinin verimliliği incelenmiştir. Deney koşulları olarak pH, hidrojen peroksit ($H_2O_2$) derişimi, demir ($Fe^{+2}$) iyonu derişimi ve reaksiyon süresi belirlenmiş olup, bu parametrelerin etkileri incelenmiştir.

## 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1.BOYAR MADDESİ

Deneylerde kullanılan boyar maddesi Direct Yellow 86'dır.Kullanılan boyar maddenin kimyasal ve fiziksel özellikleri tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo **3.1** Kullanılan boyar maddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri

| Özellik | Direct Yellow 86 |
|---|---|
| Görünüm | Toz |
| Renk | Sarı |
| Koku | Kokusuz |
| Erime/Donma Noktası | Mevcut Değil |
| Hacimsel Yoğunluğu | 740 $Kg/m^3$ |
| Bağıl Yoğunluğu | Mevcut Değil |
| Sudaki Çözünürlüğü | 60 g/l |
| pH | 9.1 |

### 3.2 KİMYASAL MADDELER

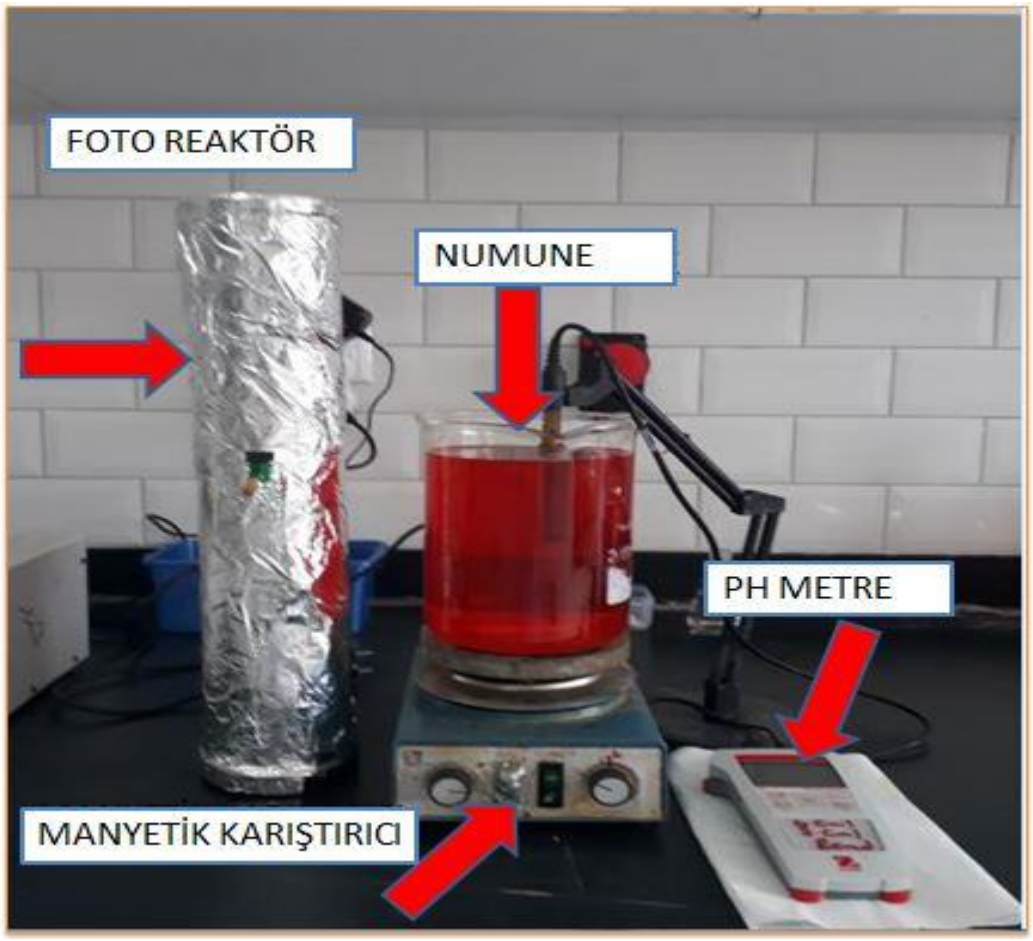
Demir(II) sülfat heptahidrat ($FeSO_4.7H_2O$) (Merck) UV/$Fe^{+2}$, Fenton ve foto-Fenton proses deneylerinde kullanılmıştır.
Sodyum hidroksit (NaOH) (Chem Pure) ve sülfürik asit ($H_2SO_4$) (Merck) numulerin pH değerini ayarlamak için kullanılmıştır.
Ağırlıkça %35'lik hidrojen peroksit ($H_2O_2$) (Merck) UV/$H_2O_2$, Fenton ve foto-Fenton oksidasyon proseslerinde kullanılmıştır.

### 3.3 CİHAZLAR

**Çizelge 3.3** Kullanılan cihazlar ve markaları

| CİHAZ | MARKA |
|---|---|
| Santrifüj | Sigma 3 - 16P |
| pH Metre | OHAUS STARTER 300 |
| Manyetik Karıştırıcı | IKAMAG RCT |
| Hassas Terazi | Radwag AS 220.R2 |
| Termoreaktör | Spectroquant TR 4220 |
| Spektrofotometre | Spektrofometer UV VIS THERMO |

Bütün proses deneyleri fotoreaktör cihazında gerçekleştirilmiştir. Fotoreaktör, 7.7 cm iç çapı, 9.02 cm dış çapında ve 48.5 cm yüksekliğinde pleksiglas malzemeden yapılmıştır. İçinde 1 adet 16 W şiddetinde UV-C (254nm) düşük-basınçlı civa buhar lambası bulunmaktadır.




**Şekil 3.1** Deneysel Düzenek

### 3.4 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tekstil sektöründe kullanılan Direct Yellow 86 boyası laboratuvar şartlarında sentetik atıksu oluşturulmuştur. Deneysel çalışmalar için iki proses de toplam çözelti hacmi 2 L olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentetik oluşturulan atıksu da önce pH değeri 1M $H_2SO_4$ çözeltisi kullanılarak istenilen değere ayarlanmıştır.

#### 3.4.1 $H_2O_2/Fe^{+2}$ Prosesi

pH'ı ayarlanan numuneye istenen derişimde $FeSO_4.7H_2O$ çözeltisi daha sonra da $H_2O_2$ çözeltisi ilavesiyle Fenton reaksiyonu başlatılmıştır.

#### 3.4.2 $H_2O_2/Fe^{+2}$/UV Prosesi

pH'ı ayarlanan numune fotoreaktör cihazına alınarak istenen derişimde $FeSO_4.7H_2O$ çözeltisi daha sonra $H_2O_2$ çözeltisi ilave edilip UV lambası çalıştırılmıştır.
Her iki proses deneylerinde numuneler, belirlenen zaman aralıklarında santrifüj tüplerine alınmış, eşzamanlı olarak pH değerleri kaydedilmiştir. Reaksiyon sonlandıktan sonra numuneler 5000 rpm de 10 dk santrifüjlenerek KOİ ve renk ölçümleri yapılmıştır.

## 3.5 ANALİZ YÖNTEMİ

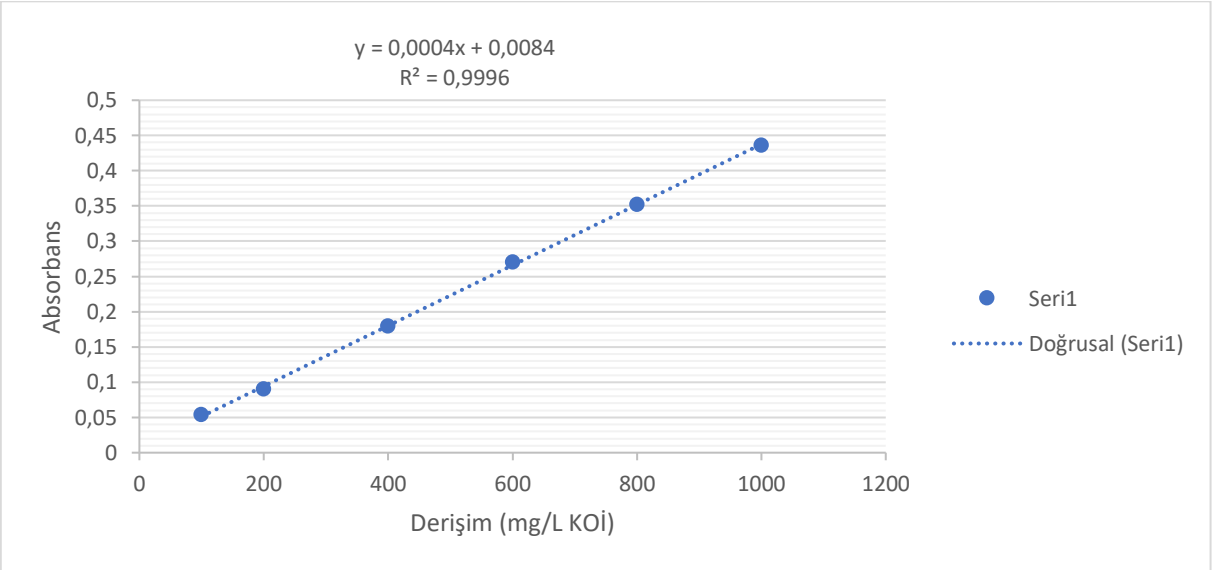
### 3.5.1 KOİ Analizi

KOİ analizinde, spekrofotometre cihazına uygun Hach Lange LCK 514 marka 13 mm çaplı KOİ test tüpleri kullanılmıştır. Tüplerin içine 1,5 ml potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$), 3,5 sülfirik asit ($H_2SO_4$) ve 2,5 numune konularak Hach Lange LT 200 marka termoreaktörde 148°C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede ölçümleri yapılarak KOİ giderim verimi hesaplanmıştır.
KOİ giderim verimi;

$$KOİ\ Giderim\ Verimi\ (\%) = \frac{(C0-C)}{C0} \times 100 \qquad (10)$$

denklemi (10) kullanılarak hesaplanmıştır.

KOİ'si bilinmeyen numunenin KOİ değerini bulabilmek için, Potasyum Hidrojen Ftalat (KHP) ($HOOCC_6H_4COOK$) Stok KOİ Çözeltisinin 0, 100, 200, 400, 800, 1000 mg/L'lik derişimlerine karşılık absorbans değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen eğri yardımıyla y = 0,0004x + 0,0084 denkleminde yerine koyularak KOİ konsantrasyonu belirlenmiştir.




**Şekil 3.2** Kalibrasyon grafiği

### 3.5.2 Renk Analizi

Tüm boya okuma işlemleri spektrofotometrede numuneler kuvars tüpe alınarak yapılmıştır. Spektrofotometrede 1.0 absorbans değerinin üstüne çıkması durumunda numuneler seyreltilerek okuma işlemi yapılmıştır. Bu durum deneylerin hassasiyetini arttırmaktadır Renk giderim verimi;

$$Renk\ Giderim\ Verimi\ (\%) = \frac{(C0-C)}{C0} \times 100 \qquad (11)$$

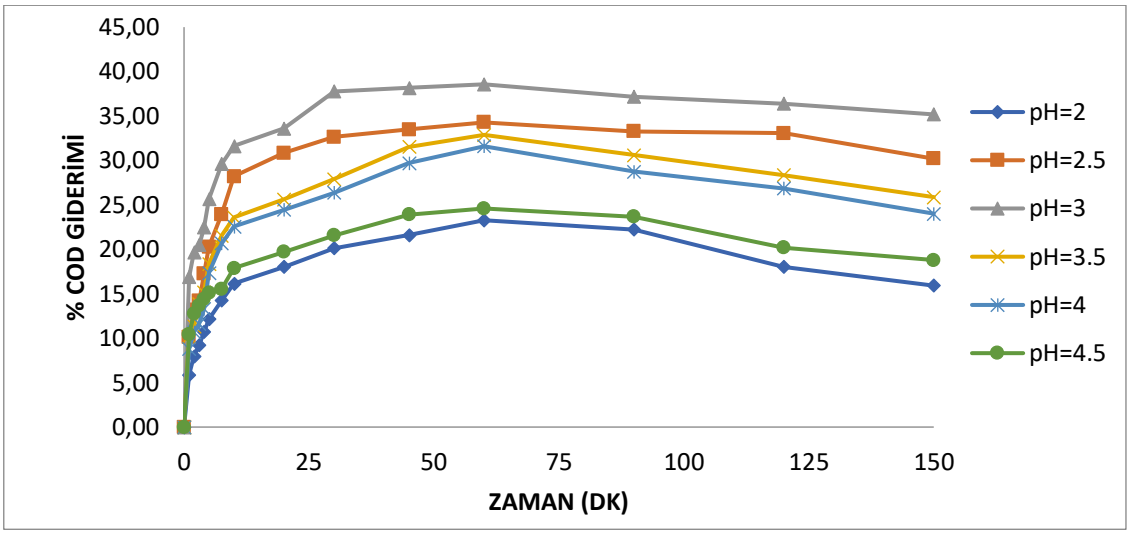
denklem (11) kullanılarak hesaplanmıştır.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

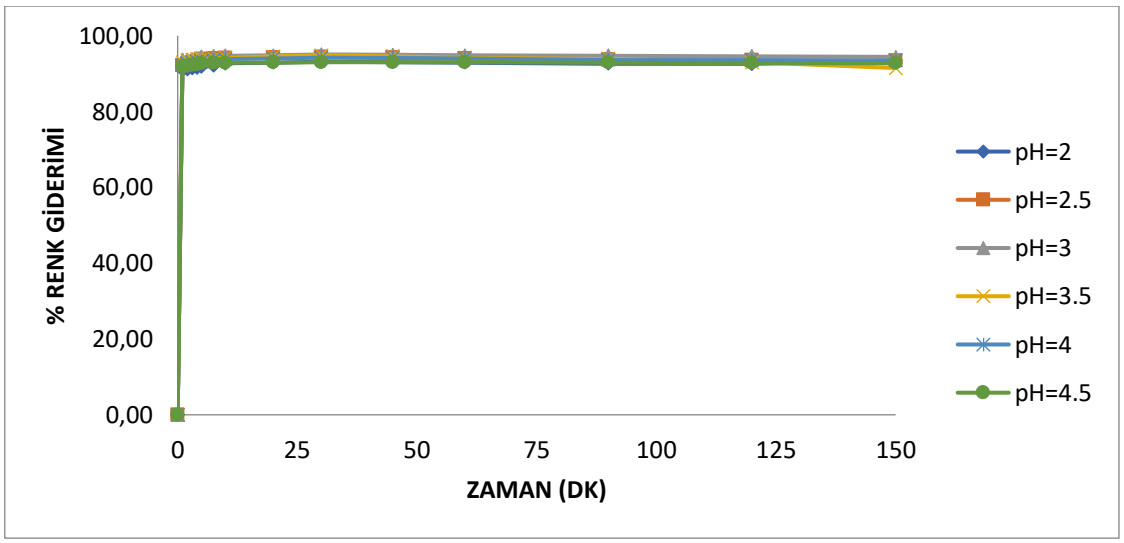
### 5.1 $H_2O_2/Fe^{+2}$ PROSESİ

- **pH Etkisi**

pH etkisi incelemelerinde istenilen pH aralığına getirmek için $H_2SO_4$ veya NaOH kullanılmıştır. Hacimsel değişikliklerden kaçınmak için minimum miktarda asit ve baz eklemek için değişik derişimlerde asit ve baz seçilmiştir. pH; 2, 2,5, 3, 4,5 değerleri kullanılarak zamana karşı giderim verimi incelenmiş, elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.




**Şekil 5.1** Atık suyun KOİ giderim veriminin pH ile değişimi ($H_2O_2$=60 mM, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 150 dk)

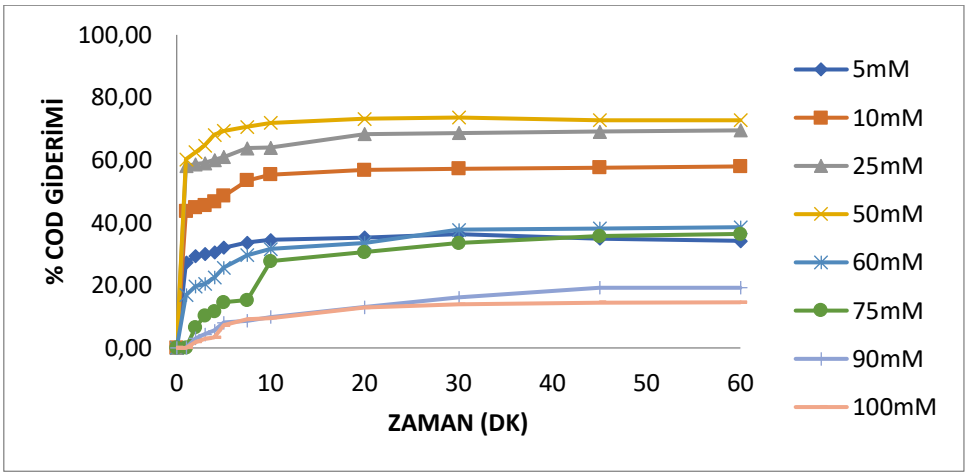



**Şekil 5.2** Atık suyun renk giderim veriminin pH ile değişimi ($H_2O_2$=60 mM, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 150 dk)

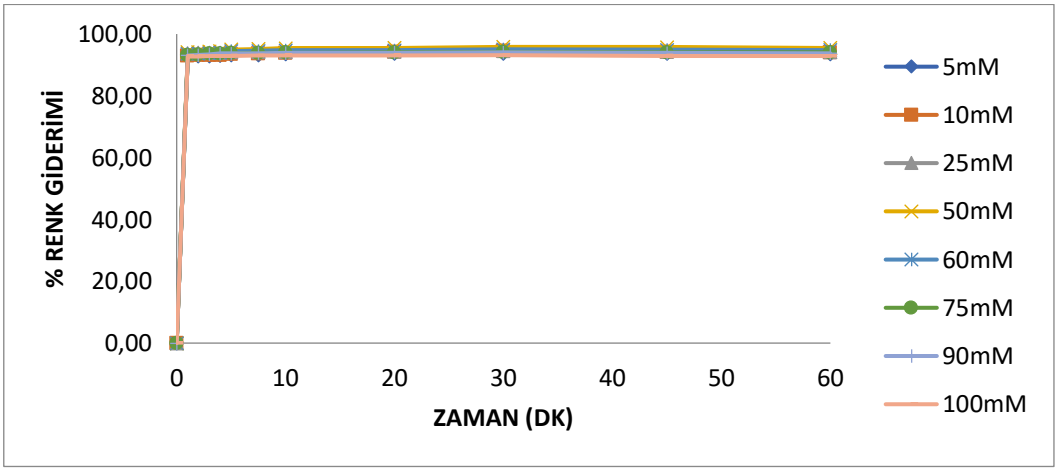
Atık suda düşük pH değerinde $FeOOH^{+2}$ oluşturmaktadır. Oluşan $FeOOH^{+2}$, hidrojen peroksit ile reaksiyona girmek için demir iyonları ile yarışır. Bu nedenle düşük pH değerinde daha az hidroksil radikali üretilir. pH > 4 olduğu zaman Fe(II) daha kararsızdır ve kolayca Fe(III) iyonu oluşturur (Su vd., 2011). Elde edilen deneysel sonuçlara göre en iyi pH değeri 3 olarak bulunmuştur. pH 3 de % 38,57 KOİ ve % 95,41 renk giderim verimi elde edilmiştir.

- **$H_2O_2$ Derişimi Etkisi**

Hidrojen peroksitin başlangıç derişimi arttıkça, oluşan $OH^{\bullet}$ radikalleri de artmaktadır. Buna bağlı olarak renksizleştirme ve KOİ giderim hızı ciddi bir şekilde artmaktadır. Yapılan deneylerde belirlenen en uygun pH değerlerinde hidrojen peroksit derişimi 5-100 mM aralığında değiştirilmiştir. KOİ ve renk giderim sonuçları aşağıda verilmiştir.




**Şekil 5.3** Atık suyun KOİ giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 60 dk)

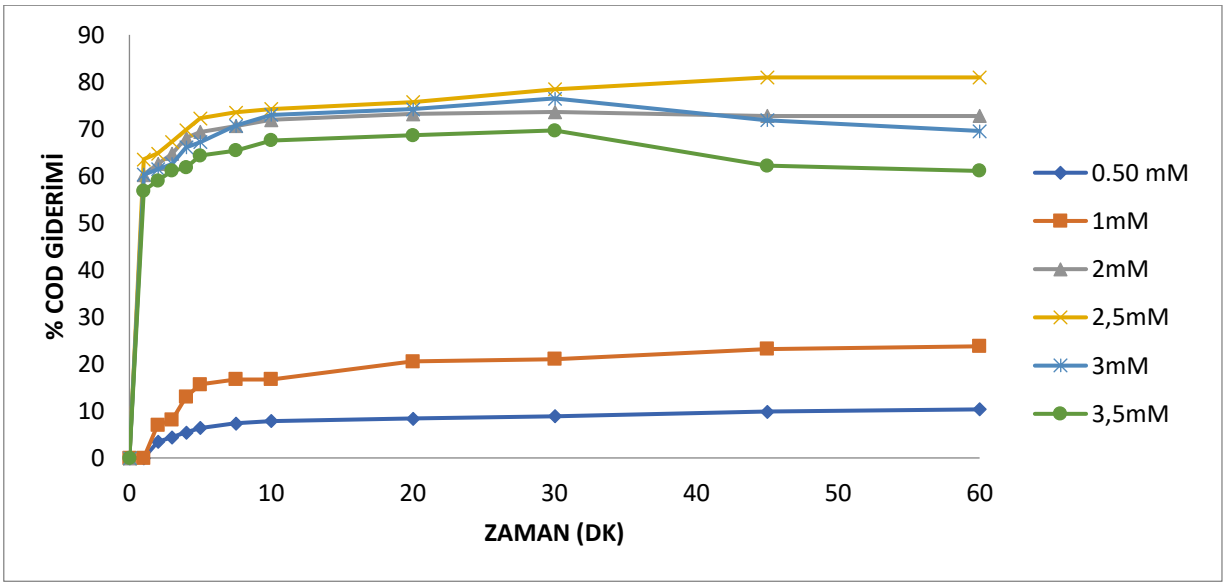



**Şekil 5.4** Atık suyun renk giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, $Fe^{+2}$=2 mM, reaksiyon süresi 60 dk)

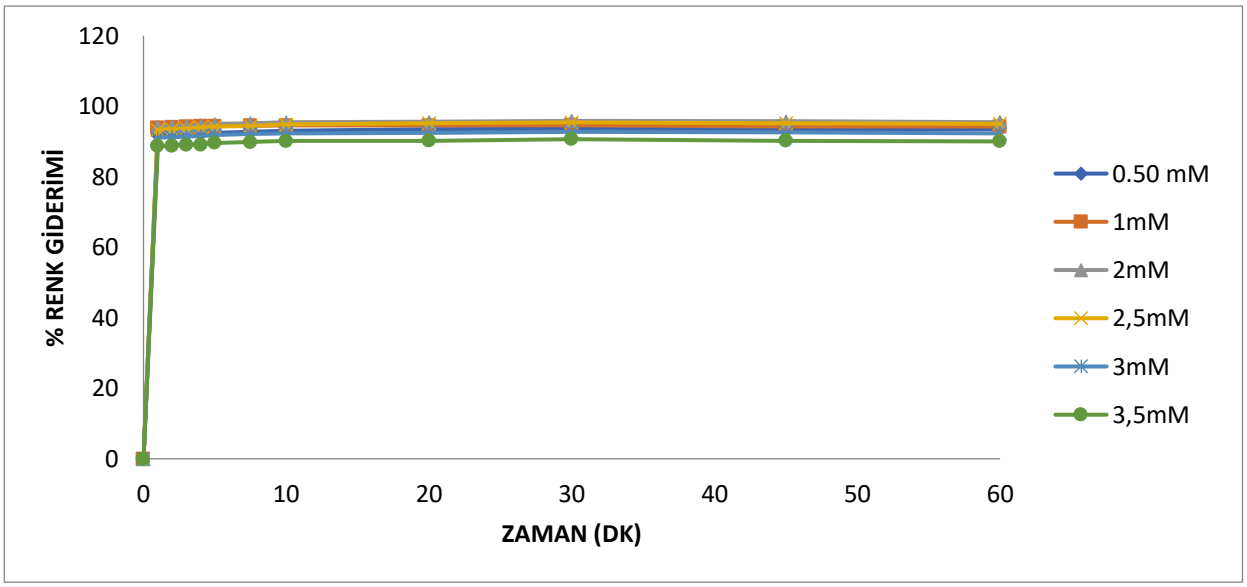
Hidrojen peroksit konsantrasyonunun artmasıyla genellikle kirleticilerin parçalanma hızı artmaktadır. Ancak, fazla miktarda hidrojen peroksit konsantrasyonu ortamdaki hidroksil radikalleriyle reaksiyona gireceğinden parçalanma hızını azaltır. Aynı zamanda fazla hidrojen peroksit konsantrasyonu KOİ'nin artmasına da neden olmaktadır (Kang ve Hwang, 2000). Belirli bir $H_2O_2$ konsantrasyon aralığında yapılan deneylerde en yüksek verim 50 mM derişim değerinde % 72,75 KOİ ile % 95,85 renk giderimine ulaşılmıştır.

- **$Fe^{+2}$ Derişimi Etkisi**

Demir iyonu konsantrasyonunun artmasıyla parçalanma hızı artar. Ancak, belli konsantrasyonun üzerinde parçalanma hızı oldukça azalır. Ayrıca, fazla demirin kullanılmasından dolayı çıkışta askıdaki demir miktarı artmaktadır. Demir iyonu derişiminin renk ve KOİ üzerine etkisi ile ilgili deneysel çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.5-5.6'da verilmiştir. Daha önceki yapılan deneylerde belirlenen en uygun hidrojen peroksit derişimi ve pH değeri kullanılmıştır.




**Şekil 5.5** Atık suyun KOİ giderim veriminin $Fe^{+2}$derişimi ile değişimi (pH=3, $H_2O_2$= 50 mM, reaksiyon süresi 60 dk)



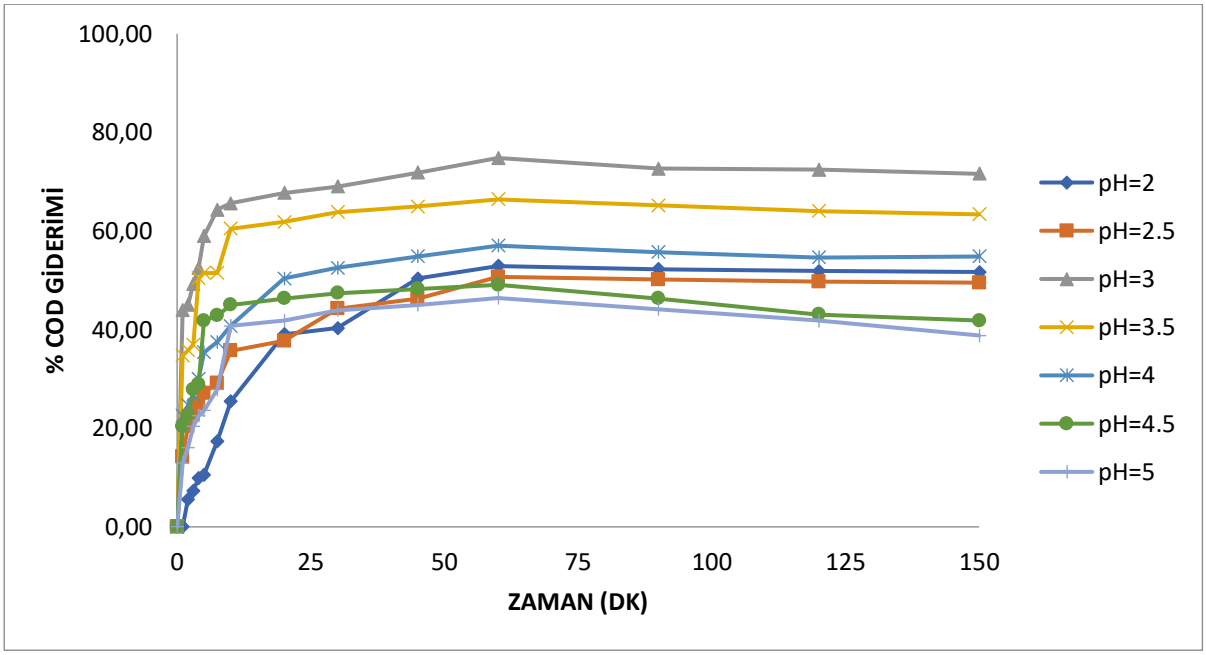

**Şekil 5.6** Atık suyun renk giderim veriminin $Fe^{+2}$derişimi ile değişimi (pH=3, $H_2O_2$= 50 mM, reaksiyon süresi 60 dk)

Düşük demir iyonu derişimlerinde ortamdaki hidrojen peroksiti katalizleyerek hidroksil radikali üretecek yeterli demir iyonu olmadığından, daha az $OH^{\bullet}$ radikali üretilir. Bu durumda üretilen az miktardaki $OH^{\bullet}$ radikalleri ile atık sudaki boya ve diğer organik kirleticilerle etkili bir reaksiyon gerçekleşmez. Yüksek demir iyonu derişimleri başlangıçta renk ve KOİ giderimini arttırsa da daha sonra $OH^{\bullet}$ radikali üzerinde süpürme etkisi yaratır (Su vd., 2011). Şekil 5.5 ve 5.6 incelendiğinde artan demir iyonu derişimi ile renk ve KOİ gideriminin arttığı görülmüştür. 1 mM gibi düşük Fe(II) derişiminde % 75,33 renk giderimi gibi yüksek bir verim elde edilmiştir. Demir derişiminin en iyi değer olarak kabul edildiği 2 mM'da ise % 77,87 renk ve % 78,38 KOİ giderim verimi elde edilmiştir.

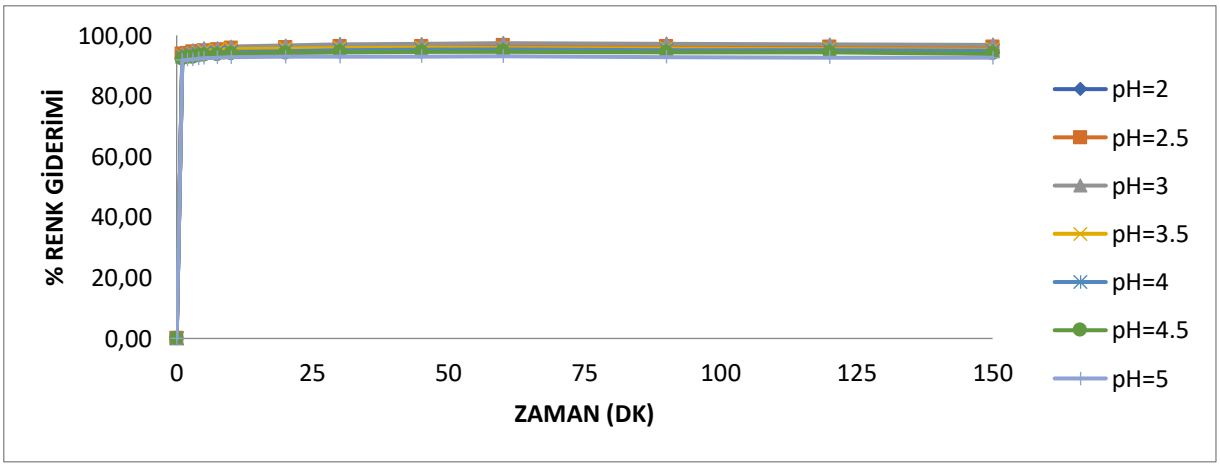
## 5.2 $H_2O_2/Fe^{+2}$/UV PROSESİ

- **pH Etkisi**

Yüksek pH değerlerinde $H_2O_2$ ve demirin kararsız olmasından dolayı boyar maddelerin renk giderim verimleri düşmektedir. Bu sebepten dolayı pH aralığı 2-5 arası tutulmuş olup, pH değerlerinin KOİ ve renk giderimi üzerinde etkisi incelenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.




**Şekil 5.7** Atık suyun KOİ giderim veriminin pH ile değişimi ($H_2O_2$=50 mM, $Fe^{+2}$=2,5 mM, reaksiyon süresi 150dk)

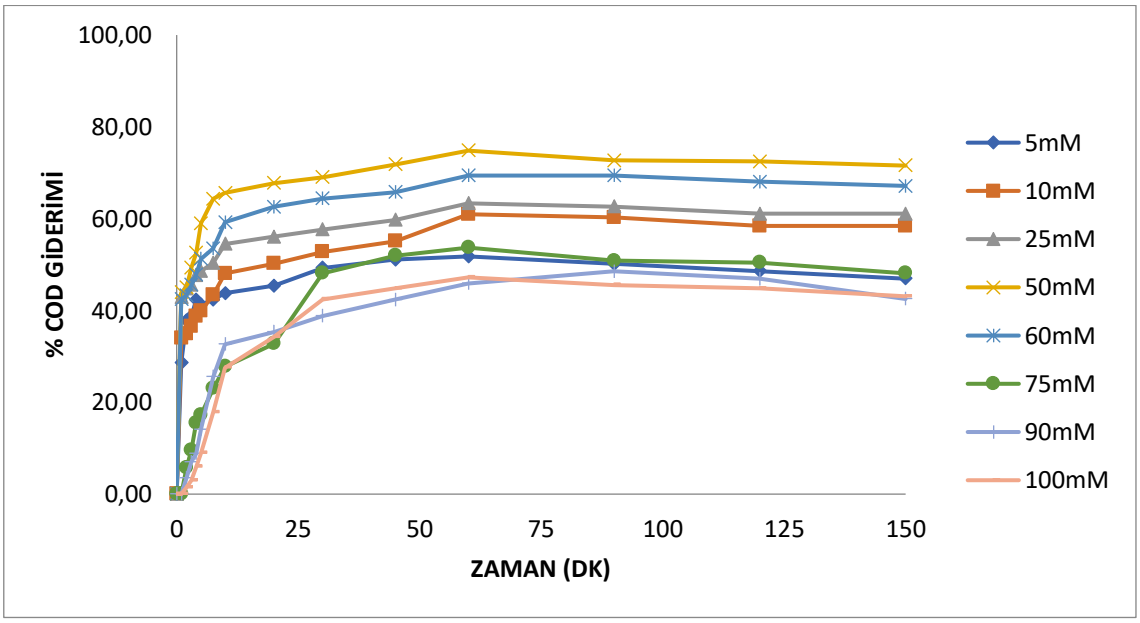



**Şekil 5.8** Atık suyun renk giderim veriminin pH ile değişimi ($H_2O_2$=50 mM, $Fe^{+2}$=2,5 mM, reaksiyon süresi 150dk)

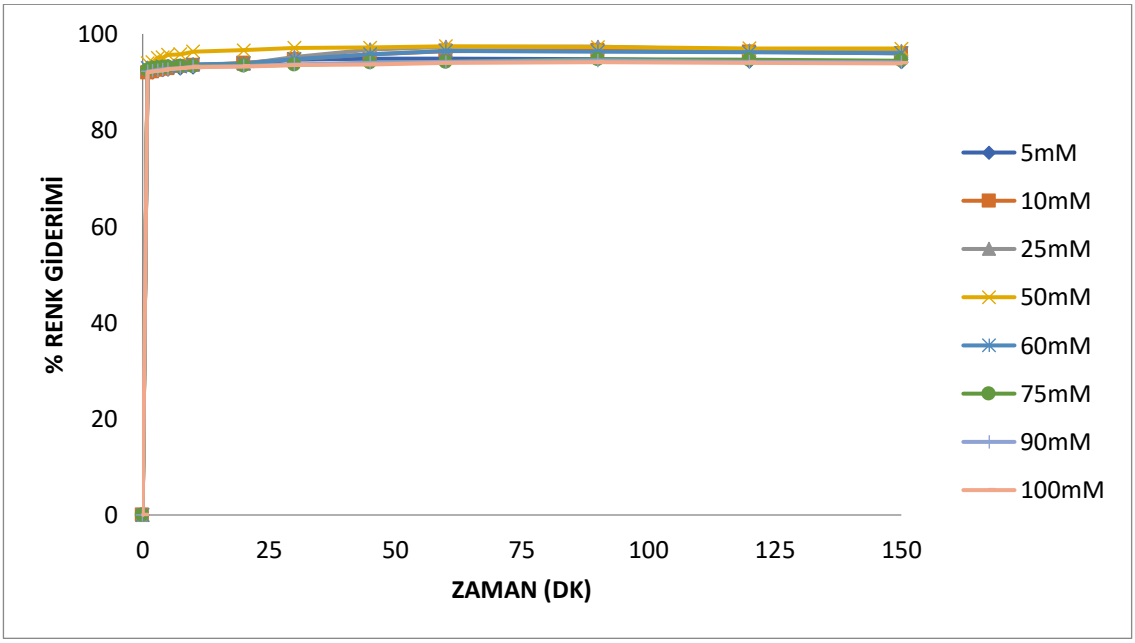
pH 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 ve 5 değerlerinde çalışmalar yapılmıştır. En iyi verim ise % 74,81 KOİ ve % 97,43 renk giderimi ile pH 3 de gerçekleşmiştir.

- **$H_2O_2$ Derişimi Etkisi**

En uygun belirlenen pH değerinden sonra en uygun hidrojen peroksit miktarını belirlemek için 5 ile 100 mM arasındaki derişimlerde hidrojen peroksit denemeleri yapılmıştır. Yapılan deneyler bir önceki aşamada bulunan en iyi pH değerinde gerçekleştirilmiş, demir derişimi sabit tutulmuştur.




**Şekil 5.9** Atık suyun KOİ giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, $Fe^{+2}$=2,5 mM, reaksiyon süresi 150dk)

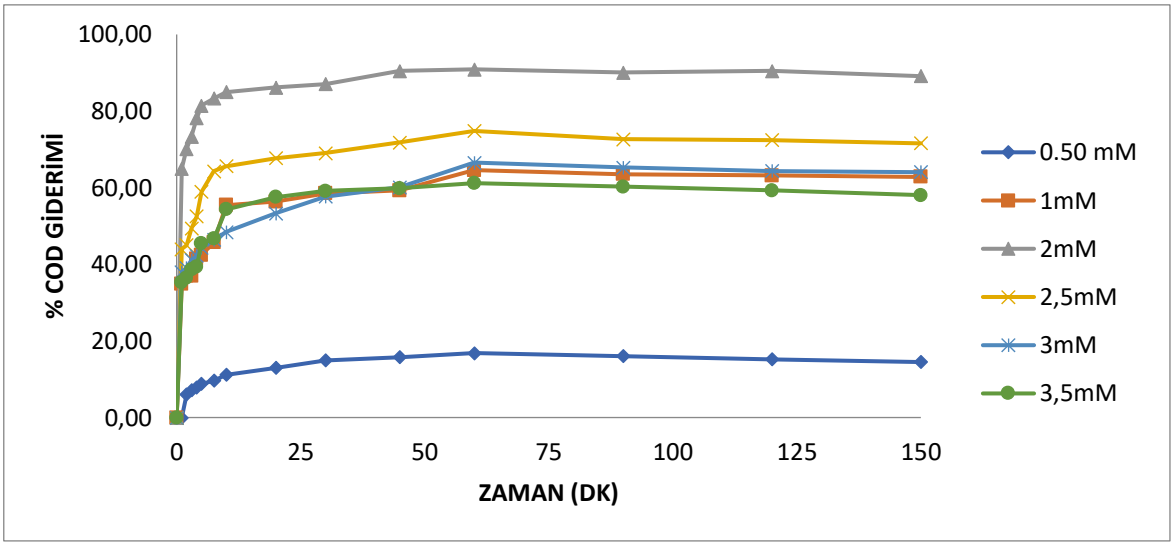



**Şekil 5.10** Atık suyun renk giderim veriminin $H_2O_2$ derişimi ile değişimi (pH=3, $Fe^{+2}$=2,5 mM, reaksiyon süresi 150dk)

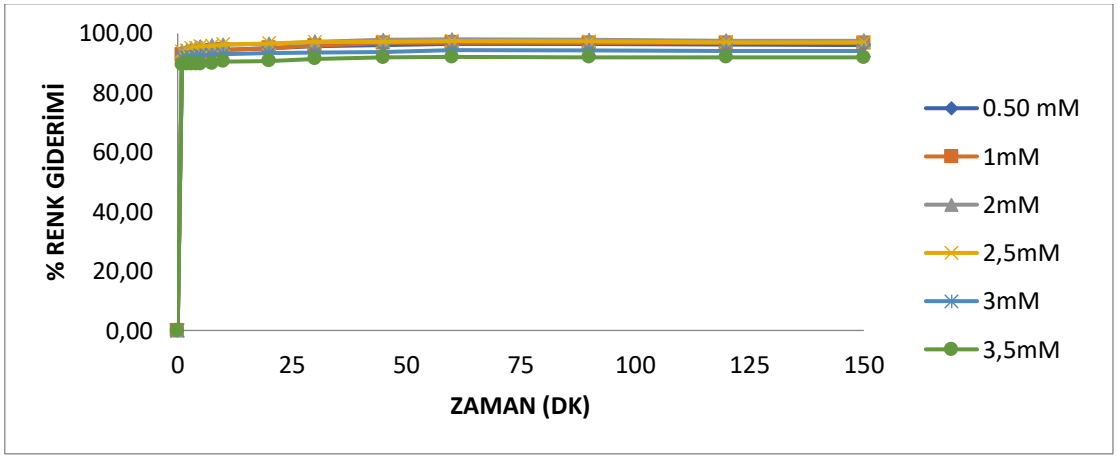
Başlangıçtaki $H_2O_2$ miktarı arttıkça, ilave üretilen $OH^{\bullet}$ radikalleri nedeni ile kirletici degradasyon verimi de artmaktadır. Ancak optimum miktardan daha fazla ortamda bulunan $H_2O_2$, $OH^{\bullet}$ radikalleri ile reaksiyona girerek çok daha düşük oksidasyon potansiyeline sahip olan $HO_2^{\bullet}$ radikallerinin oluşmasına neden olur. Ortamda optimum miktardan daha az $H_2O_2$ olması durumunda ise daha az miktarda $OH^{\bullet}$ radikali oluşmasından dolayı oksidasyon verimi ve mineralizasyon derecesi düşük olur (Solmaz ve ark. 2010). Şekil 5.9 ve 5.10 de görüldüğü üzere % 74,81KOİ ve % 95,83 renk ile en verimli giderim 50 mM $H_2O_2$ konsantrasyonunda gerçekleşmiştir.

### $Fe^{+2}$ Derişimi Etkisi

Uygun pH değeri ve $H_2O_2$ derişimi belirlendikten sonra demir iyonu derişiminin renk ve KOİ üzerine etkisi incelenmiştir. Demir iyonu derişimi 0,50-3,5 mM aralığında tutulmuştur. Sonuçlara dair grafikler aşağıda verilmiştir.




**Şekil 5.11** Atık suyun KOİ giderim veriminin $Fe^{+2}$derişimi ile değişimi (pH=3, $H_2O_2$= 50 mM, reaksiyon süresi 150 dk)




**Şekil 5.12** Atık suyun renk giderim veriminin $Fe^{+2}$derişimi ile değişimi (pH=3, $H_2O_2$= 50 mM, reaksiyon süresi 150dk)

Fenton reaksiyonunda katalisit olarak kullanılan demir iyonunun ($Fe^{+2}/Fe^{+3}$) değerliği ve başlangıçtaki miktarı, $H_2O_2$ ile reaksiyonu neticesinde oluşan $OH^{\bullet}$ radikalleri miktarına ve dolayısıyla kirletici degradasyonuna etki etmesi nedeni ile önemlidir (Solmaz ve ark. 2010). Optimum pH ve $H_2O_2$ derişiminde yapılan deney sonuçları Şekil 5.11 ve 5.12 de gösterilmiştir. Artan demir iyonu derişimi kirlilik giderim verimini de arttırmıştır. 2 mM demir iyonu konsantrasyonunda % 90,90 KOİ ve % 98,01 renk giderimi ile en iyi giderim verimi elde edilmiştir.

## 6.SONUÇLAR

Bu çalışmada; direct yellow 86 tekstil boyar maddesi ile oluşturulan sentetik atık suda ileri oksidasyon proseslerinden fenton ve foto-fenton prosesleri uygulanarak renk ve KOİ giderim verimliliği araştırılmıştır. Renk ve KOİ giderim verimine etki eden parametreler incelenip en uygun deneysel koşullar belirlenerek

uygulanan ileri oksidasyon prosesleri karşılaştırılmıştır. İleri oksidasyon proseslerinde hidrojen peroksit ve demir iyonu reaktiflerine UV ışını gibi hidroksil radikali üretimini arttırıcı mekanizma eklenerek reaksiyon süresi oldukça kısalmış, renk ve KOİ giderimi artmıştır. UV ışığının yanı sıra pH, hidrojen peroksit ($H_2O_2$) derişimi, demir ($Fe^{+2}$) iyonu derişimi gibi parametrelerin kesin olarak belirlenmesi de tekstil atık sularından KOİ ve renk gideriminde önemli olduğu görülmüştür. Optimum deneysel koşullarda Fenton prosesi için; pH:3, $H_2O_2$ konsantrasyonu: 50 mM, $Fe^{+2}$ konsantrasyonu: 2,5 mM, reaksiyon süresi 60dk maksimum % 74,81 KOİ ve % 95,85 renk giderim verimine, foto-Fenton prosesi için; pH:3, $H_2O_2$ konsantrasyonu: 50 mM, $Fe^{+2}$ konsantrasyonu: 2mM, reaksiyon süresi 150dk maksimum % 90,90 KOİ ve % 98,01 renk giderim verimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak tüm bu avantajları ve yüksek giderim verimliliği ile fenton ve foto-fenton prosesleri tekstil boyar maddesi içeren atıksularının arıtımı için alternatif yöntem olarak kullanılabilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1-Arslan-Alaton I. , 2003, The effect of pre-ozonation on the biocompatibility of reactive dye hydrolysates. Chemosphere 51, 825-833

2-Babuponnusami, A., Muthukumar, K., 2014, A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2, 557-572.

3-Baiju, A., Gandhimathi, R., Ramesh, S., & Nidheesh, P. (2018). Combined heterogeneous Electro Fenton and biological process for. *Journal of Environmental Management*, (210):328-337.

4-Barb WG, Baxendale JH, George P, Hargrave KR (1951) Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part 1. The ferrous ion reaction. J. Chem. Soc. 46, 462-500

5-Bayar, S., 2014, Fenton ve Elektrokoagülasyon Yöntemleriyle Fıstık İşleme Sanayi Atıksularının Arıtımının İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

6-Bethi, B., Sonawane, S.H., Bhanvase, B.A., Gumfekar, S.P., 2016, Nanomaterials-based advanced oxidation processes for wastewater treatment: A review, Chemical Engineering and Processing:Process Intensification, 109, 178-189.

7-Deng, Y., & Englehardt, J. (2006). Treatment of landfill leachate by the Fenton process. *Science Direct*, 3683 – 3694.

8-Harber F, Weiss JJ., 1934, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. Roy. Soc. A 147, 332-351

9-H. Wu, S. Wang, Impacts of operating parameters on oxidation–reduction potential and pretreatment efficacy in the pretreatment of printing and dyeing wastewater by Fenton process, J. Hazard. Mater. 243 (2012) 86–94.

10-J.M. Aquino, R.C. Rocha-filho, L.A.M. Ruotolo, N. Bocchi, S.R. Biaggio, Electrochemical degradation of a real textile wastewater using β-PbO2 and DSA anodes, Chem. Eng. J. 251 (2014) 138–145.

11-Kang, Y.W. and Hwang, K. 2000. Effect of reaction conditions on the oxidation efficiency in the fenton process. Water Research. (10), 2786-2790.

12-Nikravan, A., 2015, Amoxicillin and Ampicillin Removal from Wastewater by Fenton and Photo-Fenton Processes, M.Sc. thesis, Hacettepe University, 123 p.

13-Oturan, M.A., Aaron, J.J., 2014, Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications-A Review, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 44, 2577-2641.

14-Pignatello, J. (1992) Dark and photoassisted $Fe^{+3}$ catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. Environ. Sci. Technol. 26, 944–951.

15-Pouran, S.R., Aziz, A.R.A., Daud, W.M.A.W.,2015, Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 21, 53-69.

16-Rahmani, A., 2017, Heterogeneous Fenton Oxidatıon Process Using Natural Martite And Hydrogen Peroxide For Treatment Of Color in Water, M.Sc. thesis, Middle East Technical University, 201 p.

17-Solmaz S K A, Azak H, Üstün G E., Morsünbül T (2010). Pestisit Gideriminde Fenton Proseslerinin Kullanımına Yönelik Bir Envanter Çalışması. Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt 15.

18-Su, C., Pukdee-Asa, M., Ratanatamskul, C., Lu, M., 2011, Effect of operating parameters on the decolorization and oxidation of textile wastewater by the fluidized-bed Fenton process, Separation and Purification Technology, 83, 100-105.

19-Türeli, G., 2008, Treatment of an Azo Dye and Azo Dye Productıon Wastewaters with Fenton-Like and Photo-Fenton-Like Advanced Oxidation Processes, M.Sc. thesis, İstanbul Technical University, 151 p.

20-Umar, M., Aziz, H. A., & Yusoff, M. S. ,2010, Trends in the use of Fenton, electro-Fenton and photo-Fenton for the treatment. *Waste Management*, 2113–2121.

21-Ustabaş, E., 2016, İşlenmiş Ve Demlenmiş Atık Çaydan Elde Edilen Aktif Karbonun Tekstil Boyar Maddesi Metilen Mavisini Adsorplama Özellikleri Y. Lisans Tezi,Trakya Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü

22-Zhou, Oturan, & Sirés., 2018, *Electro-Fenton Process New Trends and Scale-Up*. Singapore: Springer.

# Kanatlı hayvanlarda enkapsülasyon yönteminin organik asit ve esansiyel yağlar ile birlikte kullanılmasının etkileri

Helin Atan[1], Canan Kop-Bozbay[2]

[1]Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, İzmir, Türkiye.
[2]Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Eskişehir, Türkiye.

Corresponding author's e-mail: helinnatann@gmail.com

## Özet

Enkapsülasyon, aktif olan maddenin çevresinde uygun kaplama materyali ile koruyucu bir zar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Enkapsülasyon teknolojisi günümüzde farmokoloji, kimya, kozmetik, gıda ve boya gibi farklı birçok sektörde kullanılmaktadır. Gıda ürünleri içerisinde çoğunlukla katı ve sıvı yağlar, aroma bileşenleri, vitaminler, mineraller, renk bileşenleri ve enzimler enkapsüle edilmektedir. Kanatlı sektöründe performansı arttırmak için tercih edilen katkı maddeleri, organik asitler ( **OA** ) ve esansiyel yağlardır ( **EY**). Son yıllarda yapılan çalışmalarda OA ve EY katkı maddelerinin enkapsüle yöntemiyle kullanılması, hayvan sağlığı açısından önemi kanıtlanmıştır. Organik asitler, sindirim enzimlerinin, pankreas salgılarının ve ince bağırsaktaki villus yüksekliği ve derinliğinin üzerindeki değişiklikler performansı artırabilir. Esansiyel yağlar, besin sindirimini ve emilimini arttırır, bağırsaktaki patojenlerin kolonizasyonunu azaltır, antioksidan özellikler sergiler ve hayvanın bağışıklık durumunu güçlendirir. Bu özellikler kanatlı hayvanlarda artan performansı açıklamaya yardımcı olur. Son yıllarda, katkı maddelerinin birlikte kullanılması tek bir katkı maddesi olarak kullanmasından daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca etlik piliçlerde enkapsüle yöntemiyle OA ve EY'ın birlikte kullanılması Salmonella kontrolünün iyileşmesine neden olmaktadır. Bu derleme, enkapsüle yöntemiyle OA ve EY'ın kullanımı ve performans etkileri ile ilgili araştırmacılara yol gösterecek bir kaynak olmayı hedeflemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanatlı hayvan, Enkapsülasyon, Organik Asitler, Esansiyel Yağlar

## The effects of using the encapsulation method with organic acid and essential oils in poultry

## Abstract

Encapsulation is based on the use of a protective membrane with a coating material suitable for those that are active. Nowdays, encapsulation technology is used in many different sectors such as pharmacology, chemistry, cosmetics, food and paint. In food products, mostly fats and oils, flavor components, vitamins, minerals, color components and enzymes are encapsulated. Preferred additives to increase performance in the poultry industry are organic acids (OA) and essential oils (EO). In recent studies, the use of OA and EO additives with encapsulated method has proven its importance in terms of animal health. Organic acids can alter digestive enzymes, pancreatic secretions, and villi height and depth in the small intestine. Essential oils increase nutrient digestion and absorption, reduce colonization of pathogens in the gut, exhibit antioxidant properties and strengthen the animal's immune status. These features help explain the increased performance in poultry. In recent years, it has been found that using additives together gives better results than using them as a single additive. Additionally, the use of OA and EO with encapsulated method in broiler chickens causes the Salmonella control to improve. This review aims to be a resource to guide researchers on the use of OA and EO with the encapsulated method and performance effects.

**Keywords:** Poultry, Encapsulation, Organic Acids, Essential oils

## Giriş

Enkapsülasyon; katı, sıvı veya gaz halindeki gıda bileşenlerinin, enzimlerin, hücre ve diğer maddelerin, mikroorganizmaların protein veya karbonhidrat esaslı bir kaplama materyaliyle paketlenmesi şeklinde tanımlanabilir (Cho ve ark., 2003; Gouin ve ark., 2004; Madene ve ark., 2006). Başka bir deyişle enkapsülasyon, aktif materyal olarak adlandırılan bir maddenin (küçük katı partiküller, sıvı damlacıklar veya

bir gaz) aktif materyali kapsül formunda kısmen veya tamamen izole eden, duvar/kaplama materyali veya kapsülleme ajanı adı verilen bir malzeme ile çevrelenmiş olduğu bir fiziksel kaplama işlemidir (Silva ve Meireles, 2014). Enkapsülasyon ürünlerinin ortaya çıkışı 1950'lerde, basınca duyarlı karbonsuz kopya kağıdı üretilmesi yönünde gerçekleştirilen araştırmalar sonucunda başlamıştır (Green ve Scheicher, 1955). Günümüzde ise enkapsülasyon; gıda endüstrisi, kimya, ziraat, yem, tıp, eczacılık, veterinerlik, biyoteknoloji, yem katkı maddeleri gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır (Augustin ve ark., 2001; Heinzen, 2002). Enkapsüle etme veya kaplama materyalleri olarak genellikle nişasta, nişasta türevleri, proteinler, lipidler veya bunların herhangi bir kombinasyonundan yararlanılır (Kunz ve ark., 2003). Enkapsülasyon uygulaması, aktif ve kaplama materyalinin morfoloji ve yapılardaki farklılığa bağlı olarak kapsüllerde değişiklik gösterebilmektedir. Kapsüllerin çaplarına göre enkapsülasyon işlemine farklı isimler verilmektedir (King, 1995; Gökmen ve ark., 2012). Enkapsülasyon 3 farklı boyutta yapılabilir bunlar; nanoenkapsülasyon (200 nm=0.2 µm'den küçük), mikroenkapsülasyon (0. 2-5,000 µm) ve makroenkaspsülasyon (5,000 µm' den büyük) olarak sınıflandırılmaktadır(Gökmen ve ark., 2012). Değişen ve gelişen yaşam şartları ve insanlarda sağlıklı beslenme algısının artması ile birlikte, son yıllarda gıda endüstrisinde tüketicilerin sağlıklı gıda üzerinde talepleri önemli ölçüde artmıştır. Mikroenkapsülasyon teknolojisinin gıda endüstrisinde kullanılması da oldukça eskiye dayanmaktadır. Özellikle son yıllarda fonksiyonel gıdaların öneminin giderek artması sonucunda mikroenkapsülasyon işlemi gıda sektörü için daha çok anlam kazanmıştır (Kunz ve ark., 2003). Enkapsülayon; gıda bileşenlerinin korunması, stabilizasyonu ve yavaş salınımı için kullanılan nispeten yeni bir teknolojidir. Enkapsülasyon gıdalarda özellikle raf ömrünü arttırmak, besin değerini yükseltmek, sindirilebilirliği sağlamak, olgunlaşma süresini kısaltmak gibi birçok amaçlarla uygulanmaktadır (Gharsallaoui ve ark., 2007). Son yıllarda gıdaların çeşitliliğini arttırmak ve doğallığını sağlamak gibi birçok fayda sağlamaktadır.

Kanatlı hayvanların beslemesinde, yem katkı madde kullanımı üretimin başarısı için önemli bir etkendir. Başta antibiyotik olarak kullanılan yem katkı maddelerin yasaklanması üzerine alternatif arayışlar başlamıştır. Kanatlı endüstrisi, Clostridium perfringens'e bağlı Nekrotik Enterit (NE) salgınlarını kontrol etmek, büyüme performansının ve yem yararlanma oranının iyileştirilmesi (Hashemi ve Davoodi, 2011) için etkili antibiyotik alternatiflerine ihtiyaç duymaktadır. Bununla birlikte, antibiyotiğe dirençli bakteriler et ve yumurtalarda antibiyotik kalıntılarının geçişi ile ilgili artan endişeler nedeniyle kümes hayvanı yemlerinde antibiyotik büyümesini destekleyici maddelerin kullanılması yasağı ile birlikte, NE gibi enterik bozuklukların sık görülmesine neden olmuştur (Markowiak ve ark., 2018; Swift, ve ark., 2019). Kanatlı hayvan endüstrisinde antibiyotiklerin büyüme hızlandırıcıları (AGP) olarak kullanımı tüm dünyada yaygın olarak kullanılıyordu. Başlangıçta büyüme performansını artırmak ve hastalıkları önlemek için yemlerde düşük dozda kullanımı önerilmiştir. Daha sonra antibiyotik kullanımına kısıtlama ve/veya yasaklama getirilmiştir (European Commission. Regulation, 2003; European Commission. Directive, 2004). Bu yasak ve sonuçları yapılan araştırmaları alternatif arayışına yönlendirmiştir. Son yıllarda kümes hayvanı beslemesinde antibiyotiklerin doğal alternatif bileşiklerle değiştirilmesine yönelik çalışmalar artmaktadır. Etlik piliçlerin büyüme performansı, bağırsak bağışıklığı açısından gastrointestinal sistemin sağlıklılığı ile ilişkilidir. AGP yasağı araştırmacıları pro / pre-biyotik, antimikrobiyal peptitler, yem enzimleri vb. gibi bağırsak sağlığını korumak için alternatif yaklaşımlara odaklanmaya yönlendirmiştir (Markowiak ve ark., 2018; Swift, ve ark., 2019). Doğal bileşikler arasında organik asitler ve esansiyel yağlar uygun bir seçenek olabilir (Stamilla ve ark., 2020).

**Organik asitler ve Esansiyel yağlar**

Yem katkı maddeleri arasında OA, otuz yılı aşkın süredir büyüme performansını iyileştirmek için kullanılmaktadır. Formik, asetik, propiyonik, sorbik, heksanoik, benzoik, kaprilik ve kaprik asitler gibi OA, hayvancılıkta büyüme performansını geliştirme, endojen sindirim enzimi salgısını ve aktivitesini artırma yetenekleri için antibiyotik alternatifleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yem katkı maddelerinin daha yüksek maliyetli olmasına rağmen, bu ürünlere tüketicilerin ilgisini daha çok çekmektedir (Ipu ve ark., 2006). Organik asitler, protein, amino asit ve mineral elementlerin sindirilebilirliğini iyileştirmek (Paul ve ark., 2007), bağırsak gelişimini hızlandırmak ve sağlığını iyileştirmek, bağırsak mikro ekolojik dengesini korumak ve Escherichia coli gibi kümes hayvanı patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite kullanılır (Kazempour ve Jahanian, 2017). Organik asitler, toksik bileşenlerin bakteriyel üretimini azaltarak ve bağırsak duvarının morfolojisini patojenlerin kolonizasyonunu azaltacak şekilde değiştirerek, böylece epitel hücrelerine zarar vermeyi önleyerek antibiyotiklere doğal bir alternatif olarak hizmet edebilir (Langhout, 2000). Organik asitlerin başlıca görevleri; sitoplazmik pH'ı azaltma, proteinleri ve DNA'yı denatüre eden hücre ölümüne neden olan (Cherrington ve ark., 1991) enzimatik reaksiyonları inhibe etmektir (Cherrington et al., 1991).

Genellikle, bir yem katkı maddesi olarak kullanılan esansiyel yağların hayvan performansını iyileştirdiği bilinmektedir (Kaya ve ark., 2013). Esansiyel yağlar bitki çiçeklerinden, yapraklarından, gövdelerinden,, köklerinden, tohumlardan veya meyvelerden buharla damıtma, ekstrüzyon veya çözücü ekstraksiyonu ile ekstrakte edilir ( Brene ve Roura, 2010). Esansiyel yağlar, canlı organizmalar tarafından üretilen ve bilinen taksonomik bir bütün bitki veya bitki kısmından sadece fiziksel yollarla (presleme ve damıtma) izole edilen uçucu bileşiklerin karışımlarıdır. Daha önce yapılan in vitro çalışmalar, EY'ların antibakteriyel, antiviral, antifungal, antimikotik, antiparazitik, insektisidal, antioksidan, antienflamatuar, antitoksijenik, antikonek-algılama ve bağışıklık düzenleyici olduğunu belirtmişlerdir ( Devi ve ark., 2010; Gopi ve ark., 2014; Swamy ve ark., 2016; Stevanovic ve ark., 2018). Birçok EY' ın ana bileşeni timol, karvakrol ve öjenol gibi fenolik bileşiklerdir (terpenoidler ve fenilpropanoidler) (Bassolé ve Juliani, 2012). Timol ve öjenol, mikroorganizmaların membran geçirgenliğini iyileştirdiği bilinmektedir. Ayrıca, timol, öjenol ve karvakrol yapısal olarak benzerdir ve birlikte rasyona eklendiğinde, düşük konsantrasyonlarda bile antimikrobiyal etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Bassolé ve Juliani, 2012). Yapılan çalışmalar, özellikle domuz ve tavuk rasyonlarında özellikle yetiştirme aşamasında, EY'ların yem lezzetliliği ve büyüme performansı (Jang ve ark., 2007; Emami ve ark., 2012) besinlerin sindirilebilirliğinin iyileştirilmesi için sindirim salgılarını uyardığını (Emami ve ark., 2012; Bravo ve ark., 2014) ve bağırsak mikrobiyotasını düzenlediğini göstermiştir. EY'lar ayrıca antimikrobiyal (Chowdhury ve ark., 2018) antioksidan, antienflamatuar (Mitsch ve ark., 2004) ve antiparaziter aktiviteler uyguladığı, bağırsak bütünlüğünü koruduğu ve mukozal bariyer fonksiyonlarını güçlendirdirdiği bildirilmiştir (Diaz ve ark., 2016). Esansiyel yağların, AGP ile karşılaştırıldığında daha az toksisite ile ve kalıntısız doğal antibiyotik etkisi gösterdiği kanıtlanmıştır (Zhai ve ark., 2018).

Kanatlı hayvan beslemesinde antibiyotiklerin doğal alternatif bileşiklerle değiştirme isteği araştırmacıların son yıllarda arayışa başlamasına sebep olmuştur. Doğal alternatif bileşiklerle, organik asitler ve esansiyel yağlar uygun bir seçenek olabilir. Bu nedenle, EY'lar ve OA'in yem katkı maddesi olarak kullanımı artış gözlemlenmiştir. Son yıllarda, katkı maddelerinin birlikte kullanılması tek bir katkı maddesi olarak kullanmasından daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. (Zhai ve ark., 2018). Kanatlı hayvan endüstrileri bu katkı maddelerine odaklanmıştır çünkü besin maddelerinin sindirimi ve emilimi artmıştır (Emami ve ark.,2012) ve potansiyel antioksidan özellikleri ve hayvanın bağışıklık durumunun iyileştirmesi (Zeng ve ark., 2014) ile birlikte patojenler (Placha ve ark., 2014) tarafından bağırsak kolonizasyonunda azalma göstermiştir. Bu katkı maddelerinin bağırsak mikroflorasını modüle etmedeki gerçek etkinliği, bağırsağa girdikten sonra hızlı emilim ve metabolizmaya ilişkilidir (Piva, ve ark., 2007). Mikrokapsülleme, üst gastrointestinal sistemdeki maddelerin geç bozulmasını sağlayan teknolojik bir stratejidir (Piva ve ark., 1997). Mikrokapsüllü OA ve EA karışımı ile rasyona eklenmesi, domuzlarda performans arttırdığı (Grilli ve ark., 2010) etlik piliçlerde yemden yararlanma oranını iyileştirdiği, bağırsak morfolojisi ve sindirim enzimleri aktivitesi (Liu ve ark., 2017) düzenlediği belirlenmiştir. Etlik piliçlerde yem katkı maddesi olarak tek başına veya karışık olarak mikrokapsüllenmiş OA ve EO performansları ve bağırsak mikroflorası (Gauthier ve ark., 2007) iyileştirdiği bağırsak ve dışkı patojenik mikrobiyal sayımları (Mitsch ve ark., 2004) midede pH'ı düzenlediği (Desai, ve ark., 2007) gözlemlenmiştir. Birçok çalışmada bildirildiği gibi, enkapsüle OA ve EA'n birlikte rasyona eklenmesi, domuz ve etlik piliçlerin performansını arttırdığı gözlemlenmiştir (Burt, 2004; Windisch ve ark., 2008). Daha sonra OA ve EA'n birlikte rasyona eklenmesi, potansiyel olarak antimikrobiyal etki içinde olası sinerjistik bir etki sağlayabilir (Mohan, 2020).

Pham ve ark., (2020) yaptığı bir çalışmada, 288 bir günlük erkek etlik civcivler, kontrol ve enkapsüle 500 mg/kg OA ve EY karışımından oluşan muamele 2 tekerrürden ( her tekerrür =70 civciv) oluşan deneme deseni oluşturulmuştur. Bu çalışmada, piliç tavuklarda NE'nin bir koenfeksiyon modeli kullanılarak kapsüllenmiş EY ve OA karışımı ile rasyona eklenerek büyüme performansı ve bağırsak sağlığı üzerindeki etkilerini araştırmaktı. EY ve OA karışımı ile rasyona eklenmesi, NE ile enfekte piliç tavuklarında büyüme performansını ve bağırsak sağlığını geliştirdiği gözlemlenmiştir ( Pham ve ark., 2020). Maty ve ark.,'larının (2020) yaptığı bir çalışmada, bir günlük japon bıldırcınlarda enkapsüllenmiş OA ve EY karışımının rasyona eklenmesinin büyüme performansı, bazı kimyasal parametreler ve bağırsak histomorfolijisi üzerine etkisini araştırmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Deneme, kontrol, 300 g/ton, 600 g/ton ve 900 g/ton' dan oluşan muamelelerden oluşan 3 tekerrürden oluşan (her tekerrür= 10 japon bıldırcın) bir deneme deseni tasarlanmıştır. 600 ve 900 g/kg enkapsüllenmiş OA ve EY ilave edilen gruplarda trigliseritte düşüş gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarındaki japon bıldırcınlara göre, enkapsülle beslenmiş gruplarda yemden yararlanma oranının iyileştiği, vücut canlı ağırlığının arttığı ve büyüme hormonunun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Maty ve ark., 2020). Stamilla ve ark.,'larının (2020) yaptığı bir çalışmada etlik civcivlerin, enkapsülleşmiş OA ve EY karışımı ile beslenmesinin büyüme performansı ve bağırsak sağlığı üzerine etkisi

incelenmiştir. Toplamda, 420 erkek Ross 308 civciv (1 günlük) konrol ve kapsüllenmiş organik asitler ve uçucu yağlar rasyondan oluşan 2 muamele her muamele 3 tekerrürden oluşan (her tekerrür =70 civciv) deneme deseni tasarlanmıştır. Kapsüllenmiş OA ve EY karışımı ile beslenen gruplarda yemden yararlanma oranı iyileştiği, villus yüksekliği, kript derinliği, sayısı ile ileum ve duodenum düzeylerinde bağırsak morfolojisini geliştirdiği gözlemlenmiştir. Enterobacteriaceae, Enterococci, Mezofilik bakterilerde düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak, OA ve EY karışımı ile beslenen gruplarda büyüme performansının ve bazı morfolojik bağırsak özellikleri ve bir dereceye kadar azalmış Clostridium perfringens ileumda iyileştirildiği gözlenmiştir (Stamilla ve ark., 2020)

**Sonuç ve öneriler**

Enkapsülasyon ile üretilen ürünler piyasaya sunulmakla birlikte çalışmaların çoğu laboratuvar aşamasındadır. Önümüzdeki yıllar içerisinde laboratuvar ölçeğinde yapılan çalışmaların ticari ürüne dönüşebileceği tahmin edilebilmektedir. Kanatlı hayvan beslemesinde alternatif antibiyotik arayışı devam etmektedir. Doğal alternatif olarak OA ve EY'ların kullanılması uygun görülmektedir. Enkapsüllenmiş OA ve EY birlikte rasyona eklenmesinini büyüme performansı, bağırsak gelişimi ve bağırsak mikroflorasının iyileştirilmesi için uygun olduğu gözlemlenmiştir.Sonuç olarak enkapsülasyon yönteminin yem katkı maddelerinde uygulanması giderek daha önemli bir konu haline geldiği söylenebilir. Bu manada gıda endüstrisinde bu amaca yönelik çalışmalar ve projeler yapılıp uygulama alanları oluşturularak laboratuvar çalışması halindeki birçok çalışmanın pratikte uygulanabilme imkânı sağlanabilir. Bu nedenle, çalışmamızdan, kapsüllenmiş OA ve EY birlikte rasyona eklenmesi, büyüme hormonunu, yem yararlanma oranını iyileştirebileceği, büyüme performansını ve bağırsak histomorfolojisinin yanı sıra hipokolesterolemi etkilerini geliştirdiği ve büyüme hormonu olarak kullanılabilir. Kanatlı hayvan beslemesinde, enkapsüllenmiş yem katkı maddeleri ile ilgili çalışmalar literatüre katkı sağlayacaktır.

**Kaynakçalar,**

Augustin MA, Sanguansri L, Margetts, C, & Young, BJFA 2001. Microencapsulating food ingredients. *Food Australia*, *53*(6), 220-223..

Bassolé IHN, & Juliani H 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, *17*(4), 3989-4006

Bravo D, Pirgozliev V, Rose, S P 2014. A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. *Journal of Animal Science*, *92*(4), 1531-1536.

Brenes A, Roura E 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal feed science and technology*, *158*(1-2), 1-14.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, *94*(3), 223-253.

Cherrington CA, Hinton M, Mead GC, Chopra I 1991. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 32, pp. 87-108).

Cho YH, Shim HK, Park J 2003. Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins. *Journal of Food Science*, *68*(9), 2717-2723..

Chowdhury S, Mandal GP, Patra AK, Kumar P, Samanta I, Pradhan S, Samanta AK 2018. Different essential oils in diets of broiler chickens: 2. Gut microbes and morphology, immune response, and some blood profile and antioxidant enzymes. *Animal feed science and technology*, *236*, 39-47.

Desai D, Patwardhan D, Ranade A 2007. Acidifiers in Poultry Diets and Poultry Production. Acidifiers in Animal Nutrition–A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance; Luckstdat, C., Ed.; Nottingham University Press: Nottingham, UK, 2007; pp. 63–69.

Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian, SK 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. *Journal of ethnopharmacology*, *130*(1), 107-115.

Diaz Carrasco, JM, Redondo LM, Redondo EA, Dominguez JE, Chacana AP, Fernandez Miyakawa ME 2016. Use of plant extracts as an effective manner to control Clostridium perfringens induced necrotic enteritis in poultry. *BioMed research international*, *2016*.

Emami NK, Samie A, Rahmani HR, Ruiz-Feria CA 2012. The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance, digestibility, gut

morphology and immune response of male broilers. *Animal Feed Science and Technology*, *175*(1-2), 57-64.

European Commission. Directive 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products. 136/58. Off. J. Eur. Union 2004, 136, 58–84.

European Commission. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Off. J. Eur. Union 2003, 268, 29–43.

Gauthier R, Grilli E, Piva A 2007. A microencapsulated blend of organic acids and natural identical flavours reduces necrotic enteritis-associated damages in broiler chickens. In *Proc. 16th Eur. Symp. on Poultry Nutrition, Strasbourg, France* (pp. 515-518).

Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*, *40*(9), 1107-1121.

Gopi M, Karthik K, Manjunathachar HV, Tamilmahan P, Kesavan M, Dashprakash M., ... & Purushothaman MR 2014. Essential oils as a feed additive in poultry nutrition. *Adv. Anim. Vet. Sci*, *2*(1), 1-7.

Gouin S 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*, *15*(7-8), 330-347.

Gökmen, S, Palamutoğlu R, Sarıçoban C. 2012. Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 7 (1), 36-50.

Green BK 1955. *U.S. Patent No. 2,712,507*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Grilli E, Messina MR, Tedeschi M, & Piva A. 2010. Feeding a microencapsulated blend of organic acids and nature identical compounds to weaning pigs improved growth performance and intestinal metabolism. *Livestock science*, *133*(1-3), 173-175.

Hashemi SR, Davoodi H 2011. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary research communications*, *35*(3), 169-180..

Heinzen C, Marison I, Berger A, & von Stockar U 2002. Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells, microbes and liquids in monodisperse microcapsules. *Landbauforschung Völkenrode, SH241*, 19-25.

Ipu MA, Akhtar MS, Anjumi MI, Raja ML 2006.Effects of dietary coriander seed on blood and cholesterol level in broiler. *Pakistan Vetenerian Journal.* 26:144-148.

Jang IS, Ko YH, Kang SY, & Lee CY 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, *134*(3-4), 304-315..

Kaya MG, Ozkan M, Gunebakmaz O, Akkaya H, Kaya, EG, Akpek M, ... & Berk V. 2013. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *International journal of cardiology*, *167*(5), 2306-2310.

Kazempour F, Jahanian R 2017. Effects of different organic acids on performance, ileal microflora, and phosphorus utilization in laying hens fed diet deficient in non-phytate phosphorus. *Animal feed science and technology*, *223*, 110-118.

King, AH 1995. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids

Kunz, B., Krückeberg, S. and Weissbrodt, J. 2003. Chancen und grenzen der mikroverkapselung in der modernen lebensmittelverarbeitung.Chem.-Ing.-Tech. (75), 1733-1740

Langhout, P 2000. New additives for broiler chickens. *World poultry*, *16*(3), 22-27.

Liu Y, Yang X, Xin H, Chen S, Yang C, Duan Y, Yang X 2017. Effects of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut microflora in broilers. *Animal Science Journal*, *88*(9), 1414-1424.

Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S 2006. Flavour encapsulation and controlled release–a review. *International journal of food science & technology*, *41*(1), 1-21.

Markowiak P, Śliżewska K 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens*, *10*(1), 21.

Maty HN, Hassan, AA 2020. Effect of supplementation of encapsulated organic acid and essential oil Gallant+® on some physiological parameters of Japanese quails. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, *34*(1), 181-188.

Mitsch P, Zitterl-Eglseer K, Köhler B, Gabler C, Losa R, Zimpernik I. 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of Clostridium perfringens in the intestines of broiler chickens. *Poultry science*, *83*(4), 669-675.

Mohan A, Purohit AS 2020. Anti-Salmonella activity of pyruvic and succinic acid in combination with oregano essential oil. *Food Control*, *110*, 106960.

Paul SK, Halder G, Mondal MK & Samanta, G 2007. Effect of organic acid salt on the performance and gut health of broiler chicken. *The Journal of Poultry Science*, *44*(4), 389-395.

Pham VH, Kan L, Huang J, Geng Y, Zhen W, Guo Y, ... Wang Z. 2020. Dietary encapsulated essential oils and organic acids mixture improves gut health in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *11*(1), 1-18.

Piva A, Anfossi P, Meola E, Pietri A, Panciroli A, Bertuzzi T, Formigoni A 1997. Effect of microcapsulation on absorption processes in the pig. *Livestock Production Science*, *51*(1-3), 53-61.

Piva A, Pizzamiglio, V, Morlacchini M, Tedeschi, M, Piva G 2007. Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. *Journal of animal science*, *85*(2), 486-493.

Placha I, Takacova J, Ryzner M, Cobanova K, Laukova A, Strompfova V, Faix S 2014. Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. *British poultry science*, *55*(1), 105-114.

Silva EK, Meireles MAA 2014. Encapsulation of food compounds using supercritical technologies: applications of supercritical carbon dioxide as an antisolvent. *Food Public Health*, *4*(5), 247-258.

Stamilla A, Messina A, Sallemi S, Condorelli L, Antoci F, Puleio R, Lanza M 2020. Effects of Microencapsulated Blends of Organics Acids (OA) and Essential Oils (EO) as a Feed Additive for Broiler Chicken. A Focus on Growth Performance, Gut Morphology and Microbiology. *Animals*, *10*(3), 442.

Stevanović ZD, Bošnjak-Neumüller J, Pajić-Lijaković I, Raj J, Vasiljević M 2018. Essential oils as feed additives—future perspectives. *Molecules*, *23*(7), 1717.

Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2016*.

Swift SM, Reid KP, Donovan DM, Ramsay TG 2019. Thermophile Lytic Enzyme Fusion Proteins that Target Clostridium perfringens. *Antibiotics*, *8*(4), 214.

Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of animal science*, *86*(suppl_14), E140-E148.

Zeng ZK, Li QY, Piao XS, Liu JD, Zhao PF, Xu X, ... & Niu S 2014. Forsythia suspensa extract attenuates corticosterone-induced growth inhibition, oxidative injury, and immune depression in broilers. *Poultry science*, *93*(7), 1774-1781.

Zhai H, Liu H, Wang S, Wu J, Kluenter AM 2018. Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal nutrition*, *4*(2), 179-186.

# The effects of cadmium applications on soluble compound contents of tomato (*Lycopersicon esculentum* mill. cv astona)

Elif Haklı Heybet[1], Hande Otu Borlu[*1], Veli Çeliktaş[2], Sema Düzenli[1]

[*1]Çukurova University, Faculty of Science and Art, Biology Department, Adana, Turkey
[2]Suluova Vocational High School, Amasya, Turkey.

*Corresponding author e-mail: hnd.otu@gmail.com

## Abstract

Cadmium (Cd) is a toxic metal which has a lot of harmful effects on plant metabolism. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Astona) is an important edible plant and used in this study as plant material. Just like other plants, tomato may face Cd in its life cycle. So it is aimed in this report is to investigate the effects of Cd on some important soluble compound contents (proline, soluble carbohydrate and total amino acids) of tomato. Thirty days old tomato seedlings were transplanted to hydroponic medium in the controlled room and Cd (as $CdCl_2$; 0-5-25-50 and 100 µM concentrations) was applied after one week later. On the tenth day of the hydroponic medium, plants were harvested and sampled for analyses. Data was evaluated with SPSS programme for LSD test. As a result of these, Cd had negative effects on tomato metabolism as it changed proline, total carbohydrate and amino acid levels which are the indicators of stress. In conclusion, 25 µM Cd concentration is the most effective dose for tomato seedlings' during the vegetative period.

**Keywords:** Cadmium, tomato, proline, carbohydrate, amino acid.

## INTRODUCTION

Heavy metals (metals with density higher than 5.0 g $cm^{-3}$) are important environmental pollutants and have direct and indirect negative effects on the plants (Wool Hause, 1983). Cd (density=8.6 g $cm^{-3}$) as a highly toxic heavy metal in the different ecological environments (Benavides, Gallego and Tomaro 2005). Cadmium pollution occurs by power stations, heating systems, metal-working industries, waste incinerators, urban traffic, cement factories and as a by-product of phosphate fertilizers (Di Toppi and Gabbrielli, 1999). Cd is as free ions or different soluble form or as chelating with other compounds in soils (Bingham, 1979; Hardiman and Jacoby, 1984). Crops and other plants take up Cd from the media and may accumulate in the roots and shoots (Andresen and Küpper, 2013). Cadmium effects plants negatively such as phytotoxicity symptoms on leaves and growth reduction of root and shoot. (Guo and Marschner, 1995). Also, it causes damaging on membrane permeability by lipid peroxidation(Lozano-Rodriquez et. al 1997) and high doses can affect negatively photosynthesis in plants (Ramos et al., 2002; Dias et al.,2013).

The tomato (*Lycopersicon esculentum*) is one of the most cultivated crops and has high economic value. Present world production is about 182 million tons of fresh fruit from 4.7 million ha. (FAOSTAT, 2018). A large part of this crop is grown in greenhouses ((López-Millán et al., 2009). Heavy metal concentrations in greenhouse soils were higher than field soils because of using fertilizers, and pesticides that include heavy metals (Bai et al., 2010). Cd level in growth media is important for tomato plants (López-Millán et al., 2009; Jing et al., 2005). The objectives of this work are to understand the effects of Cd on some important soluble compound contents (proline, soluble carbohydrate and total amino acids) of tomato.

## MATERIALS AND METHODS

Thirty days old tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Astona) were obtained from Güney Seedling Company and transferred to hydroponic medium pots. Whole pots were aerated with air pumps and contained (700µM K2SO4, 100 µM KCl, 2000 µM Ca(NO3)2, 750 µM MgSO4, 200 µM KH2PO4, 100 µM FeEDTA, 10 µM H3BO3, 1 µM MnSO4, 0,2 µM CuSO4, 0,01 µM (NH4)6Mo7O24.4H2O, 1 µM ZnSO4). Plants were kept in a controlled climate room (16/8 h light photoperiod, 320 µmol $m^{-2}s^{-1}$ photon flux and 25/15 $^{\circ}$C light/dark temperature and relative humidity 60-70%). One week later in hydroponic medium, 0-5-25-50 and 100 µM $CdCl_2$ applied to seedlings. Each Cd application had ten plants, and they harvested at the tenth day od Cd application.

Proline analysis was done by using Bates et al.'s (1973) method. 500 mg fresh plant material was extracted with 3% sulphosalysilic acid and filtered at blue band filter paper. Then 2 ml sample put in a glass tube; 2 ml ninhydrin solution (that contains ninhydrin, orthophosphoric acid and acetic acid) and 2ml acetic acid added on it. After incubation in boiling water for one hour, samples incubated in ice bath. After this 4 ml toluene put on the samples and read at 520 nm spectrophotometrically. Proline content of samples was calculated according to the standart curve which drowns with L-proline.

Carbohydrate analysis was conducted by using Halhoul and Kleinberg's (1972) method. For this purpose 100 mg dry powdered leaf material, homogenized with 80% ethanol. 2.5 ml anthrone solution (150 mg antron, soluted until 100 ml with H2SO4) added on to 500 µL sample in a glass tube and incubated in boiling water 5 minutes for glucose analysis. In another tube, 500 µL sample put again and 2.5 ml anthrone solution added on it. With the difference of glucose, samples incubated at 40°C water bath 30 minutes. The carbohydrate content of samples was calculated according to the standart curve which drown with D-glucose.

Total aminoacid content detected with modified Spies's protocol (1957). 1 g dry powdered plant material was homogenized with distilled water. Reaction reagent was prepared by using different solutions. The first solution, pH 5 citrate buffer, contains citric acid mohohydrate and sodium hydroxide in it. The second solution had SnCl2.2H2O and prepared with first solution. For the third solution, ninhydrin solved in ethanol. Reaction solution get ready by mixing second and third solutions equally. 1 ml homogenats put into a glass tube and 2 ml reaction reagent added on it. After 15 minutes in boiling water bath and cooling, 3 ml diluted (1/1) propanol added on samples and they read at 570 nm spectrophotometrically. Glycin was used for the standard curve.

The experiments were arranged in a randomized design. Differences amongst Cd applications, were tested using the IBM SPSS 20 software. Statistical variance analysis of the data with four replicates, was performed using ANOVA and compared with the least significant differences (LSD) at the 5% level.

## RESULTS and DISCUSSION

### Proline Content

All cadmium applications raised proline content but the only significant effect was seen at 25 µM Cd concentration (as in shown figure 1).

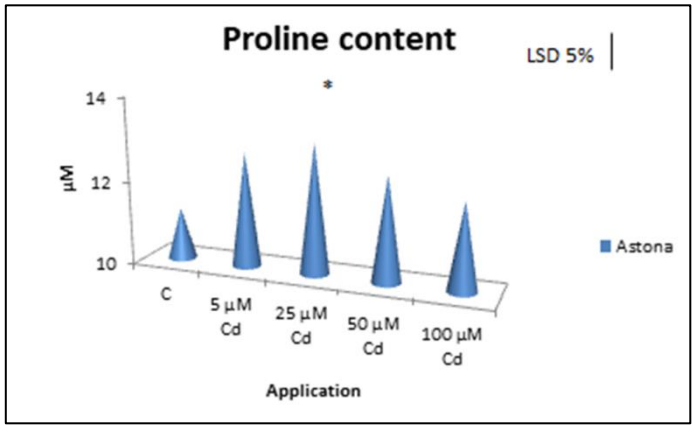



**Figure 1.** The effects Cd applications' on tomato seedlings' proline content

In this study, accumulation of proline was increased as compared to the control under Cd stress which is in accordance with the finding of Zhao (2011). Dinakar et al. (2008) also reported that Cd treated plant tissues showed a significant increase in proline as compared to the control plants. Balestrasse et al. (2005) reported that proline levels increased in the roots of soybean plants with Cd stress.

Proline is a molecule that works commonly in plant response to abiotic stress. Many plants accumulate this compound in stress conditions such as water deficiency, heavy metal, salinity, high and low temperature, pathogenic infections, nutrient deficiencies, atmospheric pollution and UV radiation (Sharma and Dietz, 2006). The great parts of plants can increase the proline content by 100 fold under stress (Matysik et al., 2002). There

have been many studies showing that proline content increases in heavy metal stress (Schat et al., 1997). The important role of proline in the response to heavy metal toxicity may be related to its antioxidative roles (Siripornadulsil et al., 2002), ability to protect enzymes (Maheshwari and Dubey, 2007) and the working as metal chelator (Sharma et al., 1998).

**Carbohydrate (Glucose and Fructose) Content**

25 µM Cd dose increased glucose content significantly. In addition to this, Cd concentration also increased fructose content but fructose decreased by 100 µM Cd significantly. Carbohydrate content was increased up to 25 µM of Cd while it was reduced significantly only upon adding 25 µM of Cd (as shown in figure 2 and 3).

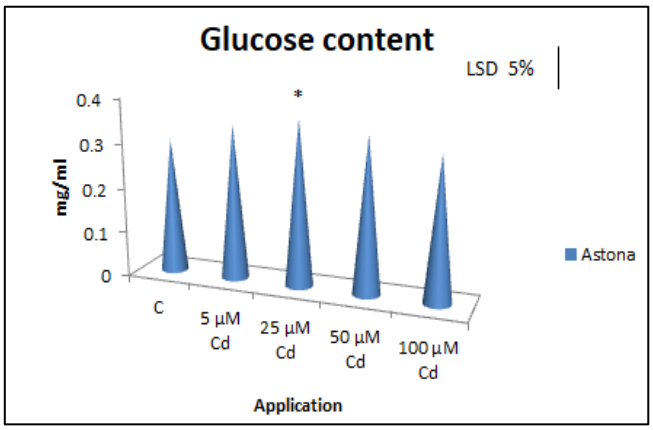



**Figure 2.** The effects Cd applications' on tomato seedlings' glucose content

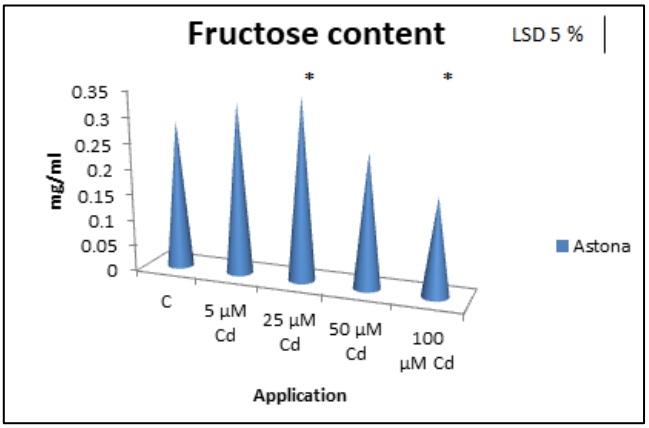



**Figure 3.** The effects Cd applications' on tomato seedlings' fructose content

These findings were supported by previous researches (Greger et al., 1991; Greger and Bertell, 1992) and could be explained by the reduction of $CO_2$ fixation and photosynthesis in Cd-treated plants. Carbohydrates synthesized are the actual last products of photosynthesis and are extremely sensitive to heavy metals (Rosa et al. 2009). In our study, the accumulation of soluble sugars in leaves was enhanced by Cd. Starch and soluble sugars accumulation in leaves was used as a key to detect cadmium toxicity (Rosa et al. 2009). Under stress conditions, soluble sugar accumulation can play as an osmolyte to continue leaf cell turgor (Rolland et al. 2006). Linger et al. (2005) showed that the accumulation of sugars in the leaves and chloroplasts would produce a significantl down regulation of photosynthesis.

**Total Aminoacid Content**

Amino acid content increased against cadmium applications, however, this increment was found significant only at 25 and 50 µM Cd doses (as shown in figure 4)

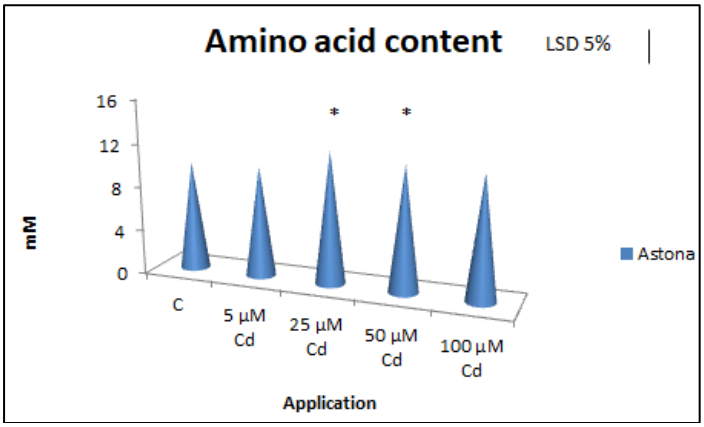



**Figure 4.** The effects Cd applications' on tomato seedlings' total aminoacid content

The activities of nitrate reductase and nitrite reductase, enzymes of nitrogen metabolism, are diminishing thus nitrate assimilation of plants is reduced in cadmium stress conditions (Gouia et al., 2000). Chaffei et al (2004) found that the nitrate content of tomato leaves and roots treated with 50 µM Cd was found to be 24% and 62% lower than control plants and also it was determined that the total amount of amino acids increased.

## CONCLUSION

All findings show that Cd had harmful effects on tomato soluble compoınd content, because it changed proline, total carbohydrate and total amino acid levels which are the indicators of stress. In conclusion, 25 µM Cd concentration is the most effective dose for tomato seedlings' life cycle.

## REFERENCES

Andresen, E., & Küpper, H. (2013). Cadmium toxicity in plants. In Cadmium: from toxicity to essentiality (pp. 395-413). Springer, Dordrecht.

Bai, L. Y., Zeng, X. B., Li, L. F., Chang, P. E. N., & Li, S. H. (2010). Effects of land use on heavy metal accumulation in soils and sources analysis. Agricultural Sciences in China, 9(11), 1650-1658.

Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., Benavides, M.P. and Tomaro, M.L., 2005. Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. Plant Soil, 270: 343-353.

Bates, L., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39, 205-207.

Benavides M, Gallego MS, Tomaro ML. 2005. Cadmium toxicity in plants. Braz. J. Plant Physiol 17:2134.

Bingham, F. T. (1979). Bioavailability of Cd to food crops in relation to heavy metal content of sludge-amended soil. Environmental Health Perspectives, 28, 39-43.

Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M.H and Masclaux-Daubresse, C., 2004. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in Lycopersicon esculentum leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. Plant Cell Physiol, 45(11):1681-1693.

Di Toppi, L. S., & Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. Environmental and experimental botany, 41(2), 105-130.

Dias, M. C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., & Santos, C. (2013). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. Acta physiologiae plantarum, 35(4), 1281-1289.

Dinakar, N, Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Udaykiran, Y. and Damodharam, T., 2008. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing Arachis hypogaea L. seedlings. Journal of Environmental Sciences 20, 199-206.

Gouia, H., Gorbel, M.H. and Meyer, C., 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. Plant Physiol. Biochem. 38: 629-638.

Greger, M. and Bertell, G., 1992. Effects of Ca2+ and Cd2+ on the carbohydrate metabolism in sugar beet (Beta vulgaris). J. Exp. Bot. 43: 167-173.

Greger, M., Brammer, E., Lindberg, S., Larsson, G. and Idestam-Almquist, J.,1991. Uptake and physiological effects of cadmium in sugar beat (Beta vulgaris) related to mineral provision. J. Exp. Bot., 239: 729-737.

Guo, Y., Marschner, H., 1995. Uptake, distribution and binding of cadmium and nickel in different plant species. J. Plant Nutr. 18, 2691_/2706.

Halhoul, M.N. and Kleinberg, I., 1972. Differential determination of glucose and fructose, and glucose- and fructose-yielding substances with anthrone, Anal Biochem 50:337-343.

Hardiman RT & Jacoby B (1984). Absorption and translocation of Cd in bush beans (Phaseolus vulgaris). Physiologia Plantarum 61: 670–674.

Jing, D. O. N. G., Fei-bo, W. U., & Guo-ping, Z. (2005). Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. Journal of Zhejiang university science B, 6(10), 974.

Linger, P., Ostwald, A. and Haensler, J., 2005. Cannabis sativa L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. Biol. Plant. 49: 567-576.

López-Millán, A. F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A., & Abadía, J. (2009). Cadmium toxicity in tomato (Lycopersicon esculentum) plants grown in hydroponics. Environmental and Experimental Botany, 65(2-3), 376-385.

Lozano-Rodriguez, E., L.E. Hernánde, P. Bonay and R.O. Carpena-Ruiz, 1997. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. J. Exp. Botany, 306: 123-128.

Maheshwari, R. and Dubey, R.S., 2007. Nickel toxicity inhibits ribonuclease and protease activities in rice seedlings: protective effects of proline. J. Plant Growth Regul., 51: 231-243.

Matysik, J., Alia, Bhalu, B., and Mohanty, P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science, 82, 525-532.

Ramos, I., E. Esteban, J.J. Lucena and A. Garate, 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of Lactica sp. Cd-Mn interaction. Plant Science, 162: 761-767.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J., 2006. Sugar sensing and signalling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 675-709.

Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., Gonzalez, J.A., Hilal, M. and Prado, F.E., 2009. Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. Plant Signal. Behav. 4: 388-393.

Schat, H., Sharma S.S. and Vooijs, R., 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of Silene vulgaris. Physiologia Plantarum, 101, 477-482.

Sharma, S.S. and Dietz, K.J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stres. Journal of Experimental Botany, 57, 711-726.

Sharma, S.S., Schat, H. and Vooijs, R., 1998. In vitro alleviation of heavy metal induced enzyme inhibition by proline. Phytochemistry, 46: 1531-1535.

Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S. and Sayre, R.T., 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. Plant Cell, 14: 2837-2847.

Spies, J.R., 1957. Colorimetric procedures for amino acids. In: Methods in Enzymology, vol. III (Colowick S. P., and Kalpan N. O., eds.). Academic Press, NY, pp. 467-471.

Wool House, H.W.: Encyclopedia of plant physiology. In: Toxicity and tolerance in the responses of plants of metals (Eds.: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziiegler). New Series, Vol. 12C, Springer-Verlag, Berlin. pp. 245-300 (1983).7

Zhao, Y., 2011. Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of Triticum aestivum L. and Zea mays L. African J. Biotech., 10, 2936-2943.

http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC

# Investigation of phase change properties of encapsulated oleic acid-hexadecane eutectic mixture

Hatice Hande Mert[1], Mehmet Selçuk Mert[2,*]

[*1]Yalova University, Chemical and Process Engineering Department, Yalova, Turkey.
[2]Yalova University, Energy Systems Engineering Department, Yalova, Turkey.

*Corresponding author e-mail: msmert@yalova.edu.tr

## Abstract

Oleic acid and n-hexadecane mixtures as phase change materials (PCMs) which have the different compositions were prepared and encapsulated by inverse emulsion polymerization technique for the thermal regulation of buildings via thermal energy storage. The eutectic phase transition temperature of OA and HD mixtures in addition to latent heat storage capacity were determined. Thermal storage properties of encapsulated eutectic mixture were determined by differential scanning calorimetry and also thermal stability was investigated by thermogravimetric analysis. The chemical structure of sample was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The analysis results demonstrated that encapsulation of oleic acid and n-hexadecane was performed successfully. The obtained material is the potential candidate for application for energy storage in buildings with thanks to its suitable phase transition temperature besides to latent heat storage capacity.

**Keywords:** Thermal energy storage, PCM, oleic acid, n-hexadecane.

## INTRODUCTION

The conservation and sustainability of energy is an important matter in recent years due to increasing energy demand. Phase change materials (PCMs) are talented materials for using thermal energy storage which can absorb or release thermal energy in the form of latent heat at a constant phase change temperature (Mert, et al., 2018). Organic based PCMs such as paraffins and fatty acids are the most used materials for thermal energy storage (Kenisarin, 2014). Although organic based PCMs have many advantages such as high energy storage capacity, thermal and chemical stability, leakage problem of these materials limits application of them in especially electronic equipment because of contamination risk (Umair, et al. 2019). Providing shape-stabilization of PCMs by encapsulation is an effective way for solve this problem. Furthermore, selection of PCMs according to their application range for thermal energy storage is crucial. The preparation of eutectic composition ratios for obtaining suitable working temperature ranges according to application area is a suitable way for this aim.

There are many works in literature related with encapsulation of eutectic mixtures of fatty acids or paraffins by using different polymeric shell. Sarı et al. (2015a) prepared and characterized micro/nanoencapsulated capric-stearic acid eutectic mixture with polymethyl-methacrylate shell for thermal energy storage in buildings. In another work, Sarı et al. (2015b) studied micro/nano encapsulation of n-tetracosane and n-octadecane eutectic mixture with polystyrene shell for low temperature thermal energy storage applications. Döğüşcü et al. (2018) prepared eutectic combinations of n-alkanes such as n-heptadecane, n-octadecane, n-nonadecane, n-eicosane and n-tetracosane, and encapsulated them in polystyrene shell. Döğüşcü et al. (2017) prepared eutectic mixture of palmitic and capric acid and encapsulated them in polystyrene shell for solar heating/cooling applications in buildings.

N-hexadecane has high latent heat storage value (191.1 J.g-1) whereas its melting peak temperature is 25.51 °C (Mert, et al., 2019). On the other hand, oleic acid has relatively low latent heat storage capacity (70.1 $J.g^{-1}$) with a melting peak temperature of 9.1°C (Beyhan et al. 2013). In this study, encapsulated oleic acid and n-hexadecane eutectic mixture was prepared which appropriate for low temperature latent heat thermal energy storage applications such as building wallboards with thanks to its reduced melting temperature.

## MATERIALS AND METHODS

2,2'-Azobisisobutyronitrile, AIBN (Aldrich Chemistry, Steinheim, Germany) was recrystallized in ethanol before using. Styrene, St (Merck, Darmstadt, Germany), divinylbenzene, DVB ( Aldrich Chemistry, Steinheim, Germany), cetyl trimethylammonium bromide, CTAB (Sigma), oleic acid (Sigma), n-hexadecane (Merck, Darmstadt, Germany) were used as received without any treatment.

Oleic Acid (OA) and n-hexadecane (HD) mixtures were encapsulated via inverse emulsion polymerization method. The volumetric core-shell ratio was fixed at 1:1for encapsulation. The ratio of styrene/divinyl benzene was kept constant to be 9:1. The composition of OA-HD eutectic PCM mixtures which are encapsulated is given in Table 1. The water phase involving CTAB and deionized water was mixed at 500 rpm by a magnetic stirrer at room temperature. Then the solution was homogenized in a ultrasonic bath for 10 min. The oil phase included St, DVB, OA and HD was mixed at 10 min at room temperature after the addition of AIBN. The water phase was added by dripping to the oil phase during the stirring mechanically. After that, the prepared oil/water emulsion was placed in ultrasonic bath and homogenized for 15 min. Then emulsion was polymerized at 70 °C for 24 h. The obtained product was precipated in ethanol and the obtained capsules was dried in a vacuum oven at 40 °C.

**Table 4**. The composition of OA-HD eutectic mixtures

| **Sample** | **OA (vol.%)** | **HD (vol.%)** |
|---|---|---|
| ePCM1 | 70 | 30 |
| ePCM2 | 60 | 40 |
| ePCM3 | 50 | 50 |

The chemical characterization of samples was conducted by using FT-IR spectrophotometer (Perkin Elmer, Spectrum 100) at a wavelength of 650–4000 cm-1 at room temperature. The thermal stability of samples was investigated by a thermal analyzer (Seiko TG/DTA 6300 thermal analysis system instrument, Seiko Instruments, Tokyo, Japan) at a heating rate of 10°C $min^{-1}$ under nitrogen atmosphere. The phase change properties of samples were determined by Differential scanning calorimetry (DSC) measurements with DSC 7020 (HITACHI) under nitrogen atmosphere and at 5°C $min^{-1}$ heating rate.

## RESULTS and DISCUSSION

The thermal energy storage properties of encapsulated OA-HD capsules were determined by DSC analysis. The melting and freezing curves of encapsulated samples were given in Figure 1. As can be seen from Figure 1, when the ratio of OA to HD in the mixture was 60% to 40%, both constituents melted and freezed simultaneously. According to melting curve, 18.49 °C is the eutectic transition peak temperature of OA and HD where the both of them melted at the same time at a constant temperature. The latent heat of fusion is 128 $J.g^{-1}$. On the other hand, based on the cooling curve it could be said that the encapsulated eutectic mixture crystallized at 14.19 °C and it has latent heat of crystallization of 130 $J.g^{-1}$. The encapsulated sample of ePCM2 which has composition of OA/HD:60/40 has a potential for providing thermal comfort in buildings thanks to its suitable eutectic transition temperature for indoor building applications.

Chemical characterization of encapsulated sample ePCM2 which was display eutectic transition temperature was performed by FT-IR spectrophotometer. FT-IR spectra of OA-HD eutectic mixture (OA/HD:60/40), encapsulated OA-HD eutectic mixture (ePCM2) and shell material composed of St-DVB are given in Figure 2. In Figure 2a, the absorbance bands located at 2921 $cm^{-1}$ and 2853 $cm^{-1}$ are due to the stretching of aliphatic C–H groups. The band observed at 1709 $cm^{-1}$ is characteristic for the C=O group of oleic acid. In Figure 2c, the peaks located at 1600–1450 $cm^{-1}$ and 750–700 $cm^{-1}$ are due to aromatic C=C and C–H groups of the polystyrene, respectively. The spectrum in Figure2b was includes the characteristic peaks of OA-HD eutectic mixture and shell material. Based on these results, it could be stated that encapsulation of OA-HD eutectic mixture was successfully achieved.

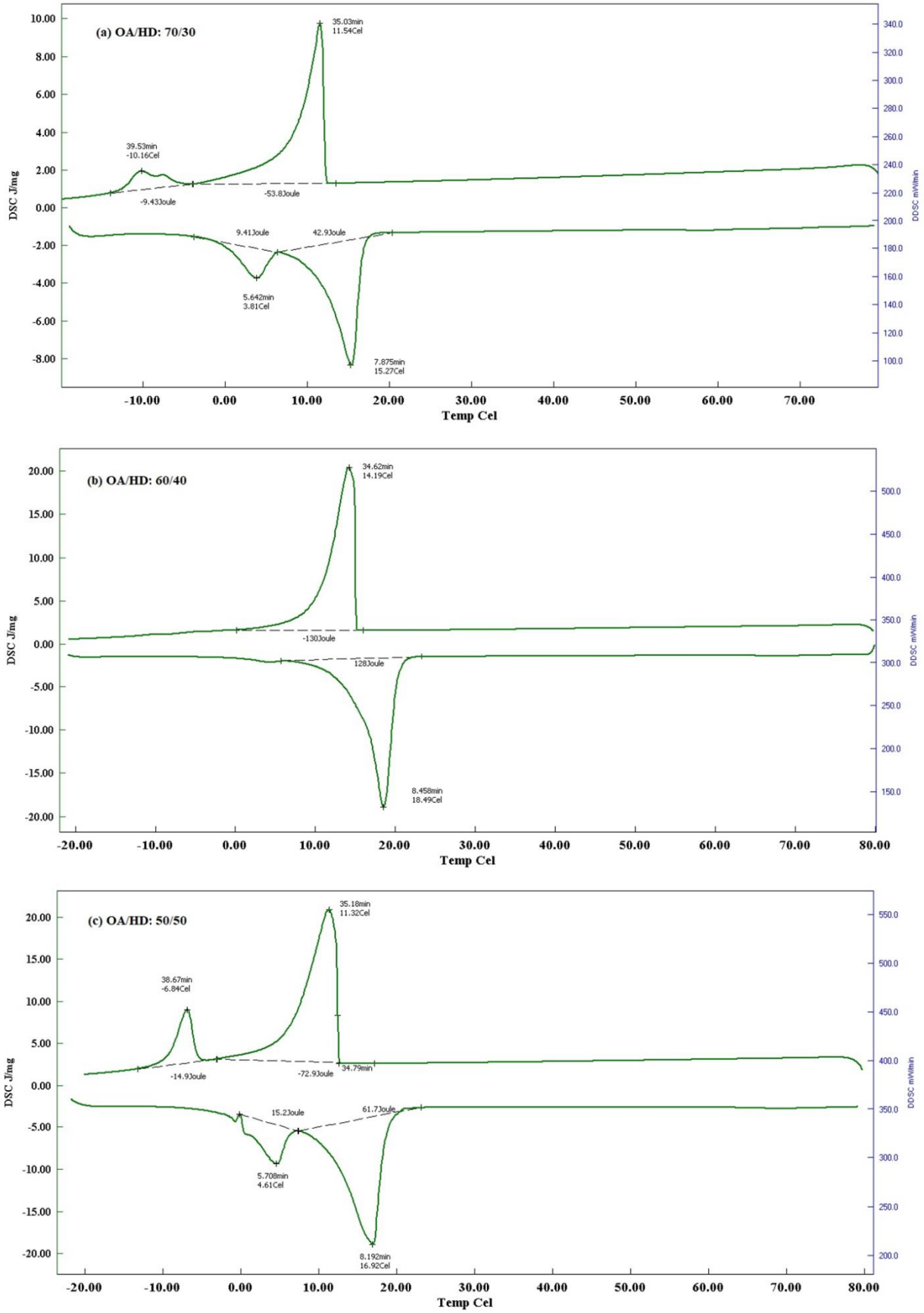



**Figure 6.** DSC curves of encapsulated OA-HD eutectic mixtures: (a) ePCM1, (b) ePCM2, (c) ePCM3

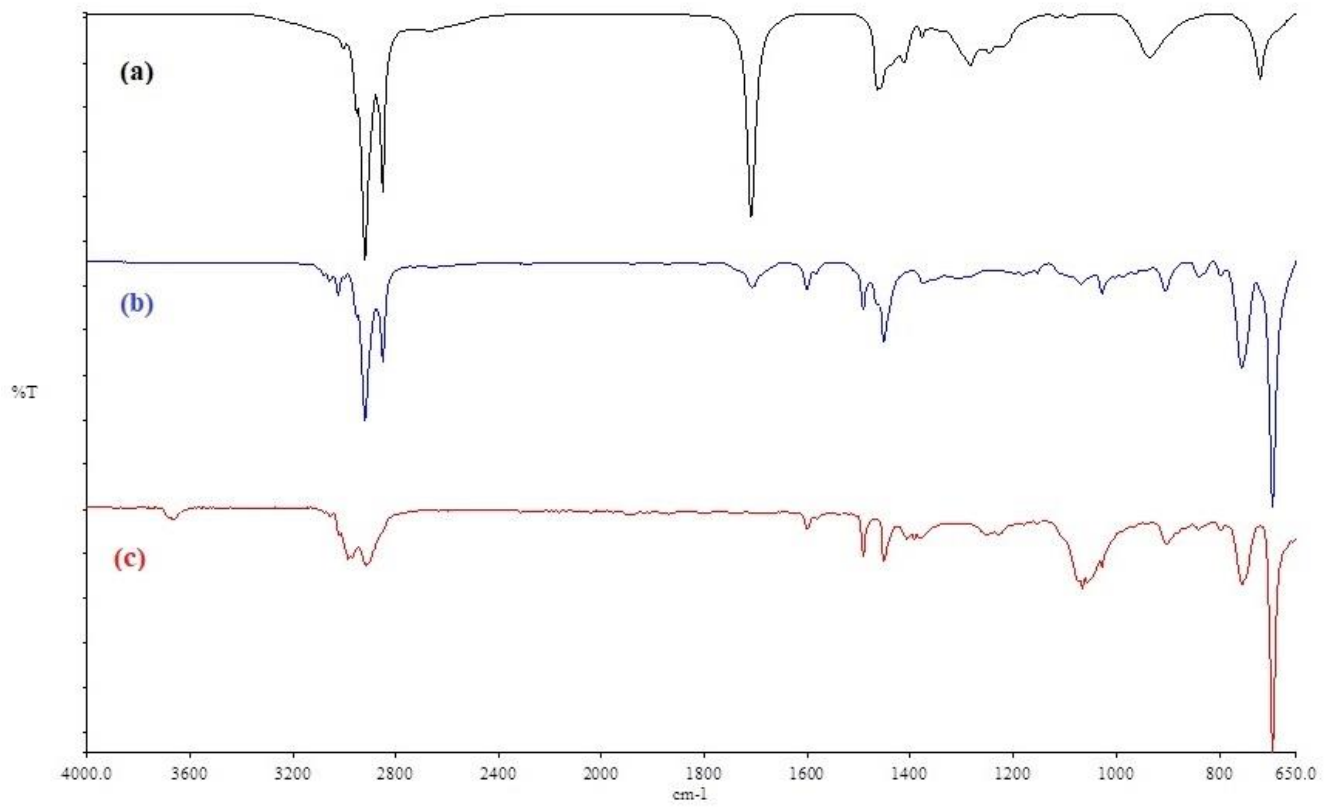



**Figure 2.** FT-IR spectra of (a) OA-HD eutectic mixture, (b) encapsulated OA-HD eutectic mixture and (c) St-DVB shell material

Thermal properties of OA-HD eutectic mixture (OA/HD:60/40), encapsulated OA-HD eutectic mixture (ePCM2) and shell material composed of St-DVB were investigated by the TG method. The analysis results are given in Figure 3 and Figure 4 in addition to data in Table 2. As can be seen from the Figure 3 and 4, OA-HD eutectic mixture and shell material degraded in one step in the temperature range of 159.4-255.8 and 382.5-450.8°C, respectively. The corresponding mass losses to decomposition at the first stage were 93.9% and 96.2% for the OA-HD eutectic mixture and shell material, respectively. On the other hand, the degradation of encapsulated OA-HD eutectic mixture occurred in two stages. In the degradation at first stage corresponds to the decomposition of core material included OA and HD in the temperature range of 132.0-189.8°C. Furthermore, degradation in the second stage was account for decomposition of shell material in the temperature range of 325.5-449.5°C with the mass loss of 35.0%. According to these results, it could be said that encapsulated OA-HD eutectic mixture almost displays similar thermal stability with shell material.

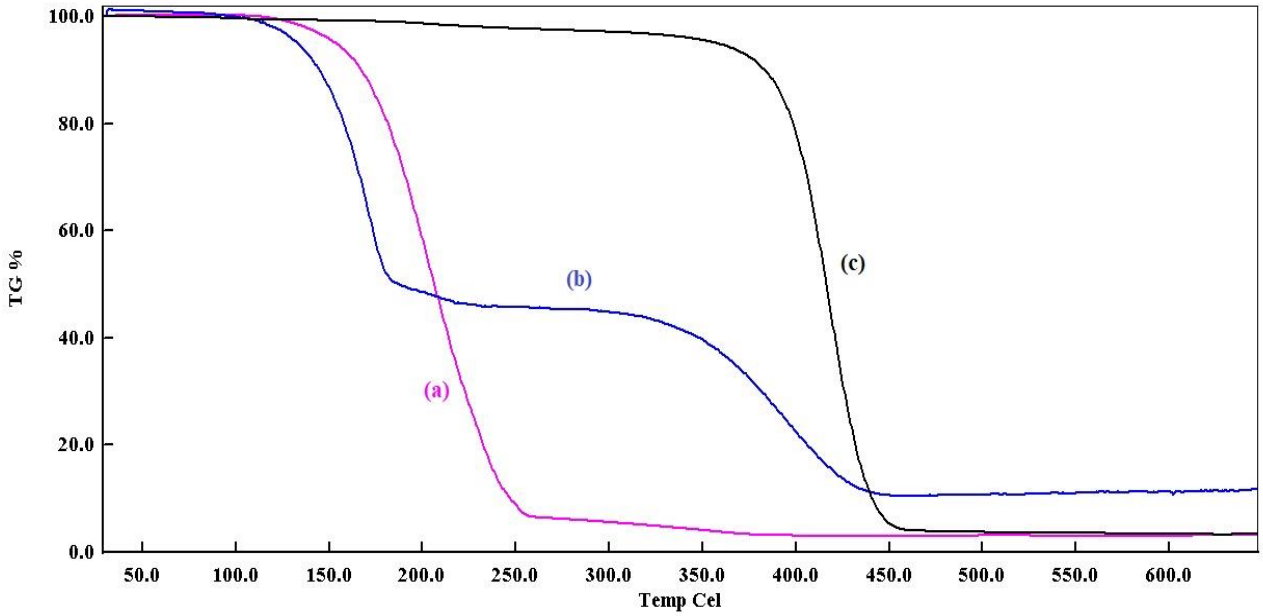



**Figure 3.** TG curves of the (a) OA-HD eutectic mixture, (b) encapsulated OA-HD eutectic mixture and (c) St-DVB shell material

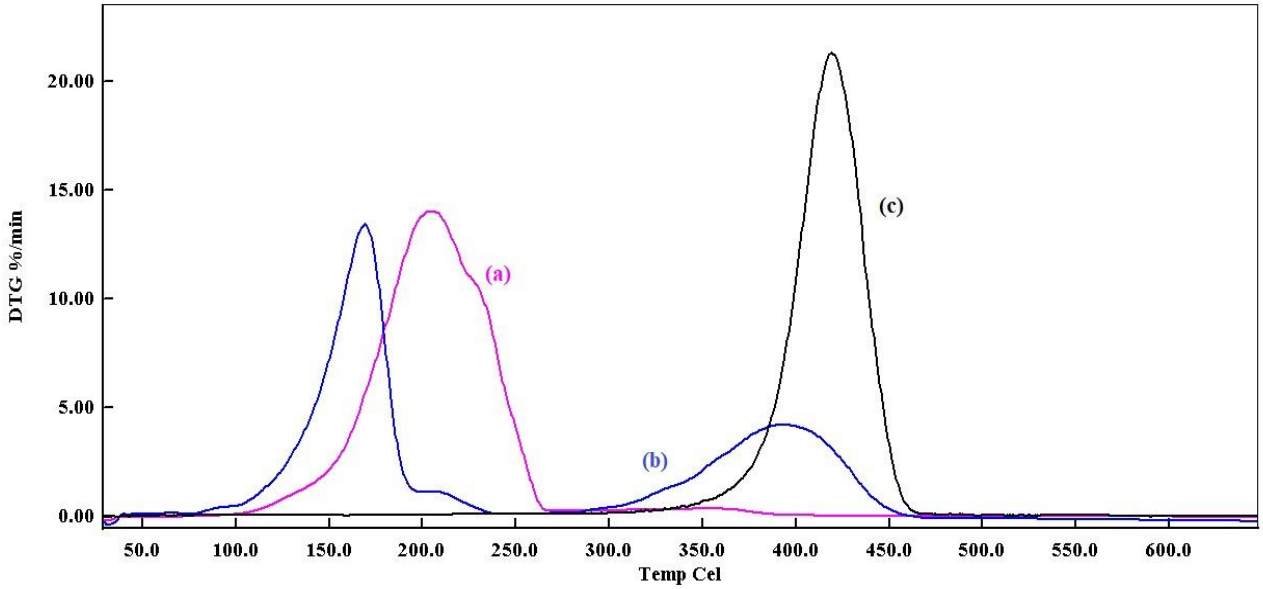



**Figure 4.** DTG curves of the (a) OA-HD eutectic mixture, (b) encapsulated OA-HD eutectic mixture and (c) St-DVB shell material

**Table 2**. TGA results of the OA-HD eutectic mixture, encapsulated OA-HD eutectic mixture and St-DVB shell material

| **Sample** | TG decomposition interval of stage-1 (°C) | DTG peak of stage-1 (°C) | Mass loss (%) | TG decomposition interval of stage-2 (°C) | DTG peak of stage-2 (°C) | Mass loss (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| St-DVB shell material | - | - | - | 382.5-450.8 | 418.9 | 96.2 |
| Encapsulated OA-HD eutectic mixture | 132.0-189.8 | 169.2 | 54.3 | 325.5-449.5 | 393.6 | 35.0 |
| OA-HD eutectic mixture | 159.4-255.8 | 205.2 | 93.9 | - | - | - |

## CONCLUSION

OA-HD eutectic mixture with the ratio of OA to HD was 60% to 40% was encapsulated successfully by inverse emulsion polymerization. The phase transion temperature and latent heat storage capacity of the encapsulated OA-HD eutectic mixture were found of 18.49 °C and 128 $J.g^{-1}$, respectively. The chemical structure of the capsules was confirmed by FT-IR analysis. TG analysis demonstrated that thermal stability of encapsulated eutectic mixture was almost as same as shell material. The obtained material is promising candidate for thermal heat storage applications and energy savings in buildings. The testing of thermal reliability and chemical stability of obtained capsules will have in view in further studies.

## REFERENCES

Mert MS, Sert M, Mert HH 2018. Isıl enerji depolama sistemleri için organik faz değiştiren maddelerin mevcut

durumu üzerine bir inceleme. Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 6(1): 161-174.

Kenisarin MM 2014.Thermophysical properties of some organic phase change materials for latent heat storage. A review. Solar Energy, 107:553-575.

Umair MM, Zhang Y, Iqbal K, Zhang S, Tang B 2019. Novel strategies and supporting materials applied to shape-stabilize organic phase change materials for thermal energy storage-A review. Applied Energy, 235: 846-873.

Sarı A, Alkan C, Özcan AN 2015a. Synthesis and characterization of micro/nano capsules of PMMA/capric-stearic acid eutectic mixture for low temperatur-thermal energy storage in buildings. Energy and Buildings, 90:106-113.

Sarı A, Alkan C, Döğüşcü DK, Kızıl Ç 2015b. Micro/nano encapsulated n-tetracosane and n-octadecane eutectic mixture with polystyrene shell for low-temperature latent heat thermal energy storage applications. Solar Energy, 115:195-203.

Döğüşcü DK, Kızıl Ç, Biçer A 2018. Microencapsulated n-alkane eutectics in polystyrene for solar thermal applications. Solar Energy, 160:32-42.

Döğüşcü DK, Altıntaş A, Sarı A, Alkan C 2017. Polystyrene microcapsules with palmitic-capric acid eutectic mixture as building thermal energy storage materials. Energy and Buildings, 150:376-382.

Mert MS, Mert HH, Gümüş CY 2019. Preparation and characterization of paraffin microcapsules for energy-saving applications. Journal of Applied Polymer Science, 136 (33):47874.

Beyhan B, Paksoy H, Daşgan Y 2013. Root zone temperature control with thermal energy storage in phase change materials for soilless greenhouse applications. Energy Conversion and Management, 74:446–453.

# Natural Material and Natural Material Additive Alginate Based Microcurrent Synthesis and Malahite Green Removal from Wastewaters

Gizem Karpuz[1*], Sevda Esma Darama[1], Semra Çoruh[1]

[*1]Department of Environmental Engineering, Ondokuz Mayıs University, 55139 Samsun, Turkey

*Corresponding author e-mail: gizemkarpuz9@gmail.com

## Abstract

Wastewater with a high concentration of dye contains, such as the textile industry, has negative effects on the environment and human health in receiving environment. In the natural environments in which they are discharged, they reduce the light transmittance and cause eutrophication and deterioration of ecological balance. Therefore, it is necessary to treat such industrial wastewater before discharge. Adsorption is an effective and easy method for dye removal. In this study, the removal of malachite green dye from wastewater by using montmorillonite, red mud, natural material added sodium alginate based microspheres as adsorbent by adsorption method was investigated. To determine the optimum adsorption conditions, different adsorbent dosages, different initial dye concentrations and adsorption experiments with different contact times were carried out. In the adsorbent dosage study with natural montmorillonite and red mud, the highest yield was calculated as 99.14% and 97.72% respectively, the highest yield in contact time study was 98.12% and 97.06%, and the highest efficiency was 98.14% and 87.9% in the initial concentration study. The highest efficiency was 75.36% and 43.64% in the adsorbent dosage study with montmorillonite and red mud added sodium alginate based microsphere, the highest efficiency in the contact time study was 41.66% and 33.12%, and the highest efficiency was 31.12% and 21.42% in the initial concentration study. . When the adsorption isotherms were examined, it was observed that the adsorption adapted to the Langmuir isotherm model in the studies in which montmorillonite and red sludge were used without additives, and the Freundlich isotherm model in the studies conducted with the microsphere with red mud and montmorillonite. Looking at the high removal efficiencies, it has been seen that there are alternative adsorbent materials suitable for use in the removal of montmorillonite and red mud malachite green.

**Keywords:** Adsorption, malahite green, montmorillonite, red mud, sodium alginate, microsphere.

## INTRODUCTION

Developments in industrial and technological fields have led to the enhancing of different industrial pollution and quite large environmental problems have occurred. Water pollution is one of the most important parts of environmental pollution and it is defined as undesired degradation of natural properties and appearance of the receiving water environments with various chemical, physical and biological effects. The reason for this pollution is due to the wastes coming from various places where people are located and wastewater caused by many production and industrial processes (Erkurt, 2008).

The textile industry has an important share in industrial pollution. The textile industry is extremely important economically in developing countries as well as in developed countries. The reason of the richness of the textile industry wastewater in terms of pollutant load is the differences in the raw materials used, the type of production, the chemicals used (Yılmaz, 2010).

Textile industry wastewaters are contains a wide variety of heavy metals, organic matter, color, dissolved salts, turbidity and is given to the external environment at different pH values and requires first degree treatment (Erkurt, 2008). Since the textile industry is an industry where water is used extensively, it is an industry where large amounts of wastewater are generated. The content of these wastewater is impurities in fibers, various chemicals and dyestuffs used (Şeker, 2007).

The textile industry wastewater reduces the light transmittance in the receiving environments with the dyes they contain, therefore, it causes the photosynthesis rates of the plants in the environment to decrease and thus to decrease the production of oxygen in a natural way. In addition, dyes have a toxic effect on aquatic organisms due to the chlorides and metal ions they contain on certain concentrations. Therefore, it is dangerous

for the human health and ecosystem to give the textile industry to the receiving environments without treating the wastewater (Erkurt, 2008).

Many physical, biological and chemical based methods are used in the treatment of wastewater containing paint. These methods are; Anerobic treatment, ion exchange, flocculation/coagulation, biosorption, adsorption, fenton process, ultra filtration, electrocoagulation. The color removal efficiency resulting from these methods varies depending on the type of paint in the wastewater and makes it very difficult to choose the most suitable method for color removal from wastewater (Bozkan, 2012).

However, these technologies have high operating, equipment and chemical costs. Among these methods, adsorption attracts increased attention due to its ease of use and regeneration possibilities (Çakmak, 2004). Adsorption is meant to concentrate or concentrate ions or molecules in a phase on an adsorbent surface. The most important parameter in the selection of adsorbents to be used in these processes is that they are easy to find, inexpensive and reusable. The adsorption method is applied successfully using many different adsorbents depending on the type of pollution (Fil, 2007).

In this study, dye removal from wastewater was investigated by using montmorillonite, red mud, natural material added sodium alginate based microspheres as adsorbent with adsorption method.

For adsorption studies, parameters such as the amount of adsorbent, initial dye concentration and adsorption time were examined. However, experimental data were applied to Langmuir and Freundlich isotherm equations to determine the malachite green dye adsorption mechanism on red mud, montmorillonite, red mud added alginate based microsphere and montmorillonite added alginate based microspheres.

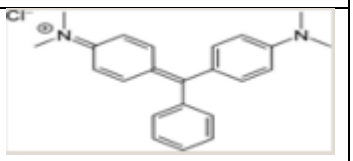
## MATERIALS AND METHODS

### Materials

In the experiments, red mud, montmorillonite and red mud added alginate based microspheres and montmorillonite added alginate based microspheres were used. Absorbent doped alginate based solution was dropped into the calcium chloride solution on the magnetic mixer with the help of a burette. microspheres were synthesized. The microspheres were then washed, dried at room temperature, and dried.

Basic dye, malachite green ($C_{23}H_{26}ClN_2$) was chosen for adsorption studies. 1000 mg/L stock solution was prepared by dissolving correctly weighed amounts of malachite green in 1000 mL distilled water. Table 1 shows some of the properties of malachite green dye.

**Table 5**. Some properties of malachite green dye

| C.I. No | CAS No. | Chemical | molecular weight | Melting Point | C.I. Name | Molecular Structure |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 42000 | 5596-64-2 | $C_{23}H_{26}CIN_2$ | 364,92 | 164 OC | Basic Dye |  |

### Method

A 1000 mg/L stock solution was prepared in distilled water and diluted according to the working concentration. Solutions of different concentrations used in the experiments were prepared by diluting from this stock. Dye concentration was measured using a UV Spectrophotometer at 617 nm. The study concentration was chosen as 50 mg/L. Working volume of dye solution was determined as 50 mL, Biosorbent dosage was chosen as 6 g/L. The contact time was chosen for 120 minutes. Adsorption process was performed in the flasks of 100 mL. The flasks were kept under agitation on a rotary shaker at 200 rpm for 2 hours.

## RESULTS and DISCUSSION

### Effect of dosage montmorillonit adsorbent on removal

Different dosage of malachite green removal efficiency of Montmorillonite, 40% montmorillonite and alginate adsorbents are given in Figure 1.

Looking at the graph, the removal efficiency has increased with the increase of dosage in all adsorbent types. Montmorillonite has a very high removal efficiency compared to others. Removal efficiency remained constant after 6 g/L dosage in montmorillonite. Low dosages of alginate have higher yields than 40% montmorillonite. however, this situation is the opposite in high dosages. Removal efficiency of 6 g/L adsorbent dosage selected for use in experiments; montmorillonite, 40% montmorillonite and alginate as 98.04%, 34.88% and 43.40%, was obtained respectively.

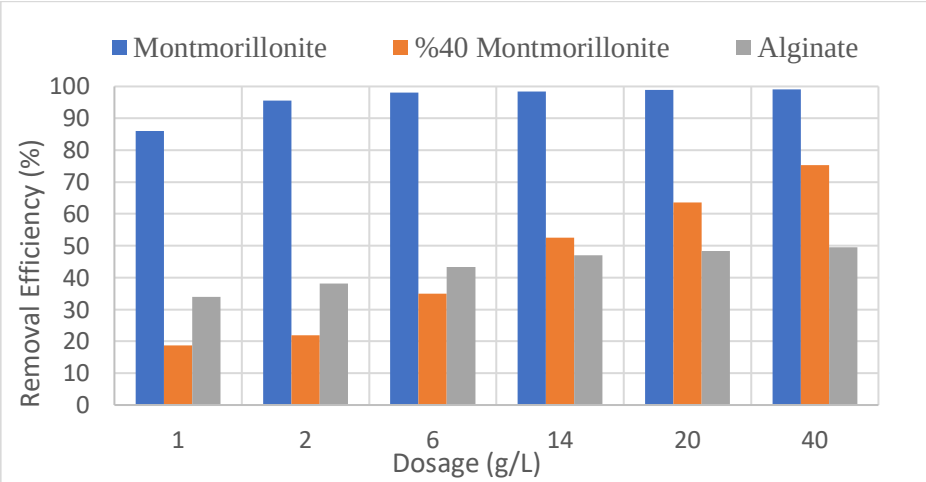



**Figure 7.** Effect of dosage montmorillonite, 40% montmorillonite and alginate on removal efficiency

### Effect of dosage of red mug adsorbent on removal

Different dosage of malachite green removal efficiency of red mug, 40% red mug and alginate adsorbents are given in Figure 2. Referring to Figure 2, the highest removal efficiency was achieved with red mud at all adsorbent dosages. Efficiencies up to 14g/L dosage increased, after this value removal efficiency at increasing dosage remained almost constant. Tthe highest removal efficiency were obtained in red mud, 40% red mud and alginate as 97.72%, 43.64% and 49.60% respectively. The optimum dosage was chosen as 6g/L.

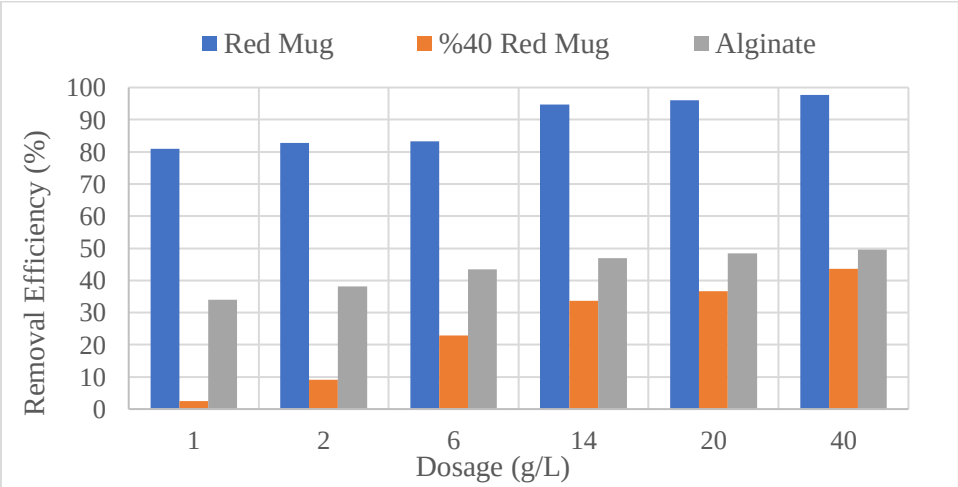



**Figure 8.** Effect of dosage red mud, 40% red mud and alginate on removal efficiency

**Effect of contact time of Montmorillonit adsorbent on removal**

In order to examine the effect of contact time on removal efficiency, experiments ranging from 1-360 minutes. Figure 3 shows the graph of the removal efficiency depending on the contact time. As seen in the graph, all adsorbents reached the adsorption balance within 15 minutes. In general, the yields were close to each other at all contact times. the highest removal efficiencies were obtained with a great difference from montmorillonite. highest removal efficiencies in montmorillonite, 40% montmorillonite and alginate, respectively; 98.12%, 41.66% and 46.8% were obtained.

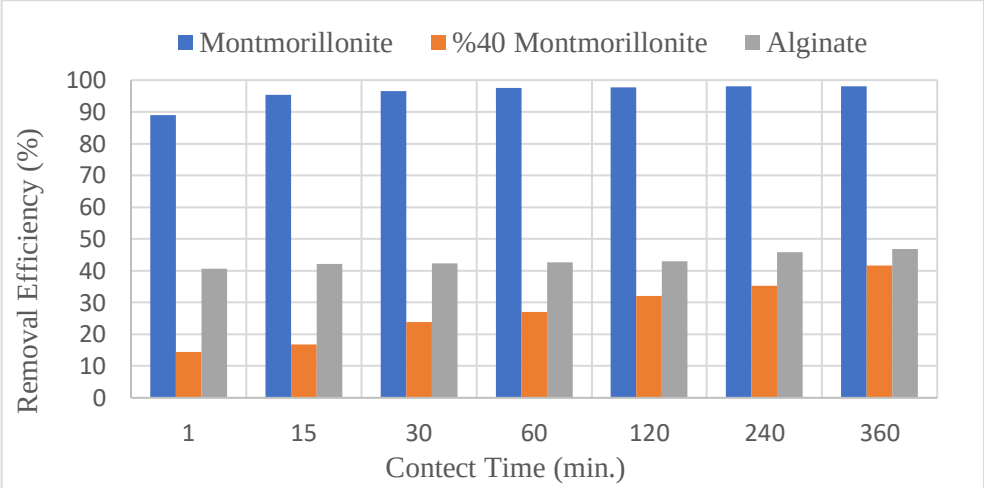



**Figure 9.** Effect of contact time montmorillonite, 40% montmorillonite and alginate on removal efficiency

**Effect of contact time of red mug adsorbent on removal**

Contact time removal efficiency results of red mud are given in Figure 4. According to the graph, removal efficiency in red mud and alginate increased rapidly in 60 minutes and after. however, 40% red mud has reached the adsorption balance from the first minute. According to the graphic, the highest removal efficiencies were obtained in red mud, 40% red mud and alginate as 97.06%, 33.12% and 46.80% respectively.

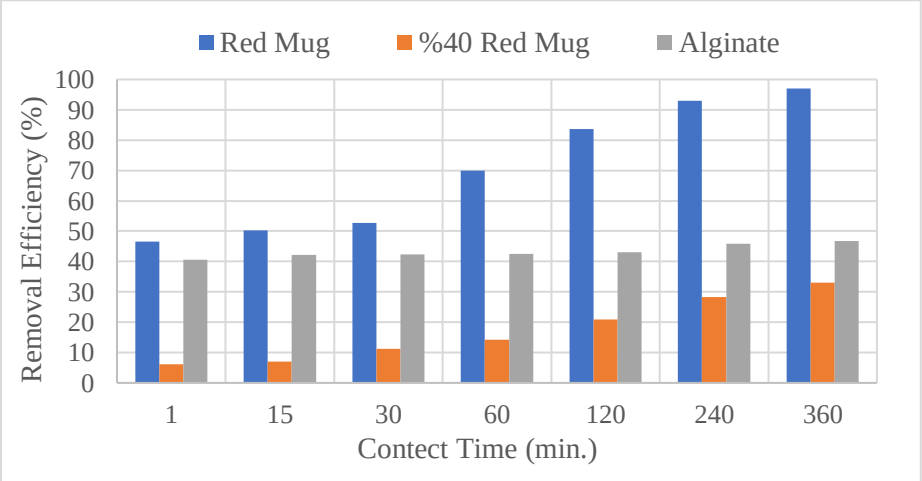



**Figure 10.** Effect of contact time red mud, 40% red mud and alginate on removal efficiency

**Effect of contact time of Montmorillonit adsorbent on removal**

In order to examine the effect of the initial pollutant concentration on adsorption, experiments were carried out in concentrations ranging from 30-400 mg/L. The effect of montmorillonite adsorbent on initial concentration is given in figure 5. Montmorrillonite removal efficiency above 90% in all concentrations. 40% montmorillonite and alginate gave decreasing removal efficiency with increased initial pollutant concentration.

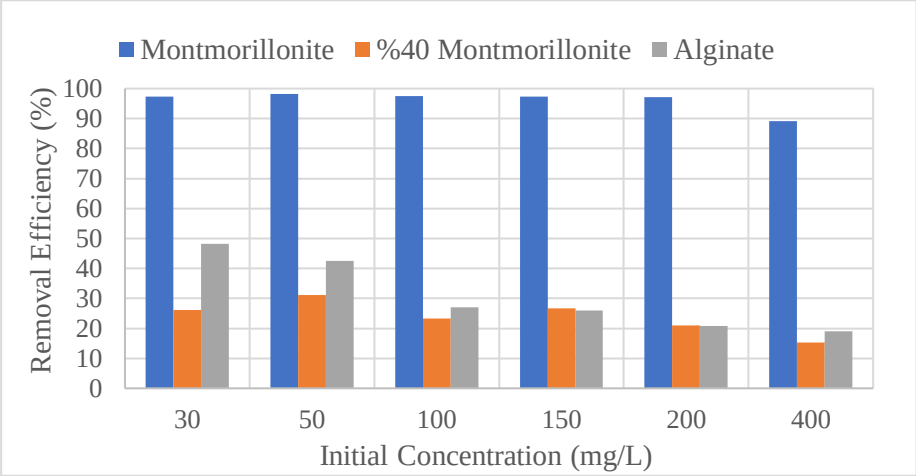



**Figure 11.** Effect of initial concentration montmorillonite, 40% montm. and alginate on removal efficiency

**Effect of contact time of red mug adsorbent on removal**

Figure 6 shows the results of the experiment carried out at the pollutant initial concentrations varying with red mud. According to the graph, all adsorbents gave decreasing yields with increasing contaminant concentrations. In parallel with previous experiments, the highest yields were obtained in red mud, the lowest yields in 40% red mud. On average, the highest removal efficiency in all adsorbent types was obtained at the initial concentration of 50mg / L. The results of this value were obtained as 84.02%, 21.42% and 42.60% for red mud, 40% red mud and alginate, respectively.

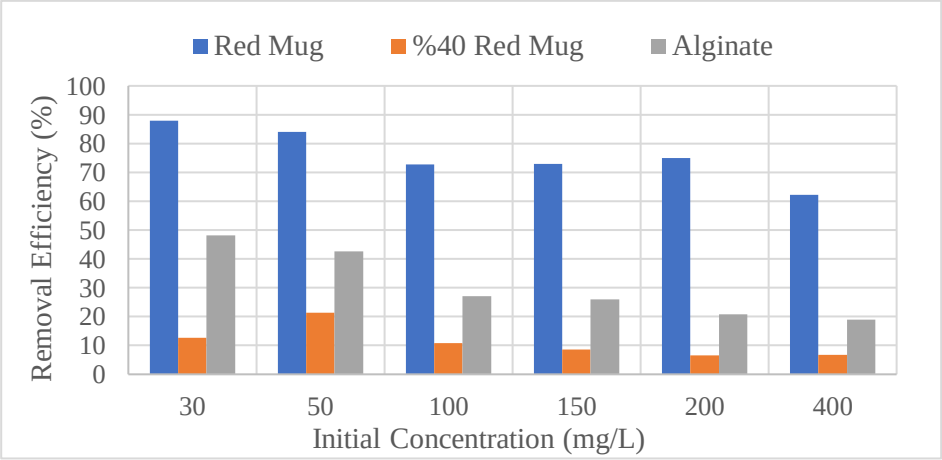



**Figure 12.** Effect of initial concentration red mud, 40% red mud and alginate on removal efficiency

**Adsorption isotherms**

Adsorption data were carry out different adsorption isotherms. In this study, experimental data were applied to Langmuir and Freundlich isotherm equations to determine the malachite green dye adsorption mechanism on red mud, montmorillonite, red mud added alginate based microsphere and montmorillonite added alginate based microspheres.

The Langmuir equation is valid for single layer adsorption on the surfaces of a finite number of identical areas, and the Langmuir isotherm equation can be written as Eqs.(1).

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K_L} + \frac{C_e}{q_m} \qquad (1)$$

There, qe, the amount adsorbed per unit weight of adsorbent (mg/g) is the equilibrium concentration of adsorbate in solution after Ce adsorption (mg/L), qm and $K_L$ are Langmuir constants related to saturated single-layer sorption capacity.

The Freundlich equation is used to describe heterogeneous systems and is as in Eqs. (2) in logarithmic form.

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n}\log C_e \qquad (2)$$

There, qe is the amount of dye adsorbed per adsorbent of dye adsorbent (mg/g) is the equilibrium concentration in Ce (mg/L), $K_F$ and n are empirical Freundlich constants, indicative of adsorption capacity and adsorption density, respectively.

Correlation coefficients with Langmuir and Freundlich parameters are given in Table 2. While montmorillonite is absorbent, langmuir equation, adsorbent montmorillonite doped alginate-based microspheres are freundlich equation, if red mud adsorbent is freundlich equation, adsorbent red mud-doped alginate-based microspheres are found to be freundlich equation and finally alginate microspheres are found to be better than freundlich equation, and finally, alginate microspheres are found to be better.

**Table 6**. Malahit yeşili boyanın bazı özellikleri

| **Isotherm Model** | **Parameter** | **Montmorillonite** | **%40 Montmorillonite** | **Red Mug** | **%40 Red Mug** | **Aliginate** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Freundlich** | **$k_F$ (L/g)** | 8,22 | 4,830 | 1,95 | 0,14 | 0,43 |
| | **n** | 1,66 | 2,352 | 1,64 | 1,80 | 1,76 |
| | **$R^2$** | 0,9015 | 0,9425 | 0,9818 | 0,8029 | 0,9636 |
| **Langmuir** | **$q_{max}$ (mg/g)** | 71,42 | 17,85 | 58,82 | 6,20 | 16,80 |
| | **$K_L$ (L/mg)** | 0,120 | 0,0004 | 0,014 | 0,004 | 0,07 |
| | **$R^2$** | 0,9929 | 0,8417 | 0,8596 | 0,6743 | 0,8056 |

## CONCLUSION

In this study, dye removal from wastewater was investigated by using montmorillonite, red mud, natural material added sodium alginate based microspheres as adsorbent with adsorption method. For adsorption studies, parameters such as the amount of adsorbent, initial dye concentration and adsorption time were examined. However, experimental data were applied to Langmuir and Freundlich isotherm equations to determine the malachite green dye adsorption mechanism on red mud, montmorillonite, red mud added alginate based microsphere and montmorillonite added alginate based microspheres.

Adsorption process is a function of contact time, biosorbent dosage and dye ion concentration. The results show that red mud, montmorillonite, red mud added alginate based microsphere and montmorillonite added alginate based microspheres are effective in removing dye ions from the aqueous solution. Experimental data was applied to various isotherm models. In terms of $R^2$ values, montmorillonite adsorbent is more suitable for Freundlich models for langmuir other adsorbents. The results show that montmorillonite and red mud can be used as a low-cost adsorbent to naturally remove malachite green dye ions from the aqueous solution.

## REFERENCES

Bozkan H 2012. Removal of azo dyes with adsorption method using olive waste (pirina). Master Thesis, Selcuk University, Institute of Science, Environmental Engineering Department, 56, Konya.

Çakmak M 2004. Investigation of adsorbability of pressure blue 41 dye by anaerobic and activated sludge biomass. Master Thesis, Çukurova University, Institute of Science, Environmental Engineering Department, 64, Adana.

Erkut E 2008. Dyestuff removal with activated carbon adsorption. Master Thesis, Anadolu University, Institute of Science, Chemical Engineering Department, 123, Eskişehir.

Fil B 2007. Investigation of the use of Montmorillonit in textile dye (methylene blue) removal. Master Thesis, Balıkesir University, Institute of Science, Environmental Engineering Department,105, Balıkesir.

Şeker A 2007. Investigation of the removal of various dyestuffs used in the textile industry with activated carbon. Master Thesis, T.C. Gebze Institute of Technology Engineering and Science Institute Environmental Engineering Department, 90, Kocaeli.

Yılmaz K 2010. Investigation of the treatability of textile industry wastewater by magnesium flocculation. Master Thesis, Çukurova University, Institute of Science, Environmental Engineering Department, 86, Adana.

# Embryo culture and applications in biotechnology

Idriss Ali Ibrahim[1*], Mehmet Sezgin[2]

[*1]Çankırı Karatekin University, Science Faculty, Biology Dept., Çankırı, Türkiye
[2]Çankırı Karatekin University, Science Faculty, Biology Dept., Çankırı, Türkiye

*Corresponding author e-mail: inalidirs@gmail.com

**Abstract**
In this study, we define a useful technique for studying the effects of media, plant growth regulators (PGR) and other chemical and physical factors on embryo growth and differentiation. It is done in two different ways; first, mature embryo culture is derived from ripe seeds, done when the embryo (do not survive in vitro and the seeds become dormant for a long time) and to eliminate the inhibition of seed germination usually with the addition of PGR to media. Second, immature embryo culture is avoided embryo abortion due to failure in endosperm development and sometimes endosperm produce toxins that would kill the embryo. Some of the factors affected the success of embryo are explant effect (explant size and time of collection), influence of genotype and culture media (macro or microelements, sucrose, amino acid, gelling agents) and growth regulators (auxins, cytokines, etc..) lastly, there are two phase of embryo culture, they are heterotrophic (which is require more complex media and higher osmatic pressure) and autotrophic phase (which is capable of synthesizing substance from salt and sucrose).
**Keywords:** Embryo culture, biotechnology, mature seed, immature seed

## INTRODUCTION

Embryo culture is a technique used for more than half a century to save hybrid fertilization products when they could otherwise degenerate. Success was first achieved in 1904 by Hanning who obtained viable plants from mature embryos of two cruciferous plants which were aseptically isolated and grown on a mineral salt medium supplemented with sugar (Norstog, 1979). Dietrich cultivated mature and immature embryos of various plant species to determine if they could still germinate without ending the dormant period in 1924. He reported that the mature embryos grew immediately, by passing dormancy. Immature embryos germinated early without further embryonic development. Since the early 1940s, embryo culture has been used increasingly to understand the physical and nutritional requirements for embryonic development, bypass seed dormancy, shorten the breeding cycle, test seed viability, provide material for micro propagation, and rescue immature hybrid embryos from incompatible crosses (Hu and Wang, 1986). In this study learn about the type, requirements for success, media, technique and applications of embryo culture.

## EMBRYO CULTURE

Embryo culture involves isolating and growing an immature or mature zygotic embryo under sterile conditions on an aseptic nutrient medium with the goal of obtaining a viable plant. The basic principle of this technique is that the integrity of the hybrid genome is preserved in an embryo that is stunted or aborted and that its potential for resumption of normal growth can be realized if it is fed with the appropriate growth substances. It is based on isolating the embryo without injury, formulating an appropriate nutrient medium and inducing embryogenic growth and continuous seedling formation. Embryo culture is of two types.

### Mature embryos culture

The culture of mature embryos from ripened seeds is used to eliminate seed germination inhibitors or to shorten the breeding cycle if, for example, dormancy is a problem. This culture is easy and only requires a simple nutrient medium with agar, sugar, and minerals.

### Immature embryo culture

The culture of immature embryos is used to rescue embryos that would normally abort or that would not undergo the progressive sequence of ontogeny. This process is difficult due to the tedious dissection necessary and the complex nutrient medium requirements. Success with this type of culture depends strongly on the

developmental stage of the embryo when it is isolated (Monnier, 1976; Raghavan, 1980). Culture technique for Embryo Rescue: the aseptically isolated of embryos can be grown in a suitable medium under optimal conditions. In general, a complex nutrient medium is required for culture methods involving embryo rescue. For adequate nutritional support of immature embryos, embryo-endosperm transplant it used in the figure below.

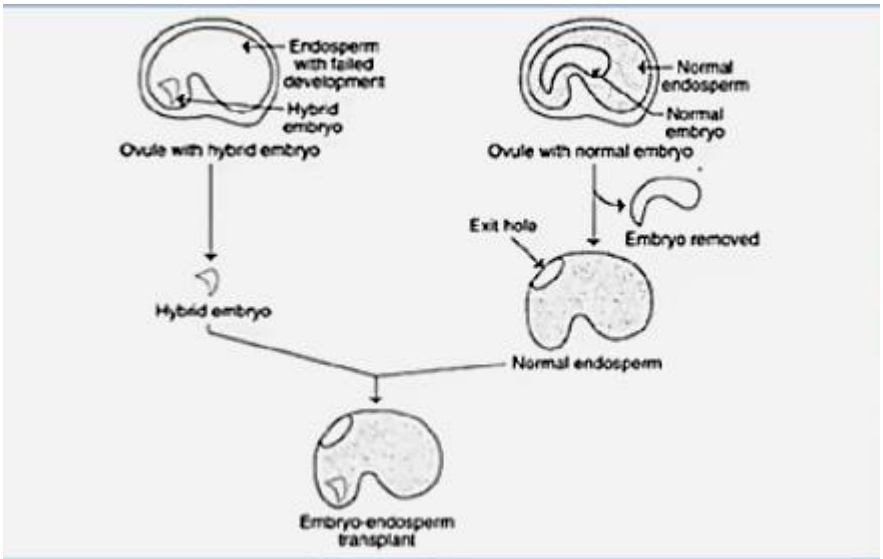



**Figure1** Embryo-endosperm transplant technique used in embryo rescue (or immature embryo culture)

**Requirements for success**

The successful development of an embryo depends on many factors. The plant genotype greatly influences success. Embryos of some species are easier to grow in culture than are others, and differences sometimes occur between closely related cultivars (Collins and Grosser, 1984; Rangan, 1984).

Light and temperature are two environmental factors that are of major concern in embryo culture. Embryos sometimes grow best when maintained in darkness for the first 1 to 2 weeks of culture and then transferred to light to allow chlorophyll formation. Isolated embryos frequently germinate in a wider temperature range than intact seeds. The optimum temperature depends on plant species, but normally a high range of 25 to 30ºC is used (Narayanaswamy and Norstog, 1964). Some embryos, from species such as Lilium, require a lower temperature, i.e., 17ºC, and others require a cold treatment of 4ºC to break dormancy (Pierik, 1987).

**Media**

In 1924, Dieterich showed that mature embryos could grow normally on a semisolid medium containing only Knop's mineral salts and 2.5% to 5% sucrose. However, many scientists believe that the most important aspect of embryo culture is medium selection. Several formulations of mineral salts have been used for embryo culture without much critical evaluation of the role of individual elements (Bhojwani and Razdan, 1983). Murashige and Skoog (1962) and Gamborg's B5 medium (Gamborg et al., 1968), with certain degrees of modification, are the most widely used basal media in embryo culture. The exact nutritional requirements depend on the stage of the embryo development.
Raghavan identified two phases of the embryonic development in 1966. In the heterotrophic phase, the young embryo depends on the endosperm and surrounding maternal tissue, and requires a more complex environment and higher osmotic pressure than older embryos. The continuous development of young embryos requires complex environments supplemented by combinations of vitamins, amino acids, growth hormones such as auxine (which is encourages plant growth by increasing the elongation of cells and proliferation. The transport of auxins synthesized in meristematic tissues, such as leaves, upper buds and flowers, down. Indole-3-acetic acid (IAA) is the only hormone naturally synthesized in plants; however, many synthetic materials were shown to have similar effects to IAA (Williams, 2011). And cytokine (which is unlike other hormones produced in plant tissues especially during cell division, they are organic substances in quinine structure found both in

plants and in animals. Cytokinins are divided into two main groups: (i) synthetic phenyl urea derivatives, thidiazuron (TDZ), urea and (ii) naturally occurring adenine derivatives, kinetin (KN) and 6- benzyl adenine (BA) (Sezgin and Kahya 2018) (Figure 2).

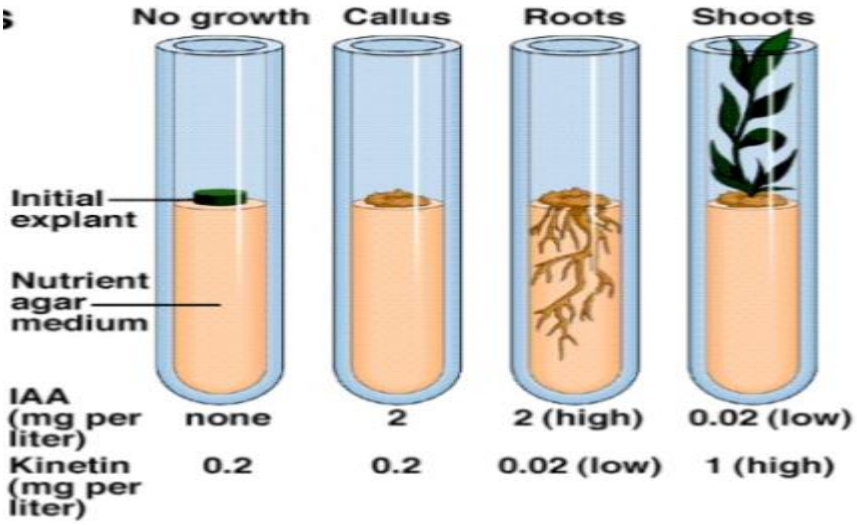



**Figure 2** Responses of Plant Tissue culture to Cytokinin and Auxin

**Technique**

Embryos are located in a sterile environment of the ovum and surface sterilization of the embryos is not necessary. Instead, whole eggs or ovaries are sterilized on the surface, and then the embryos are aseptically removed from surrounding tissue. Dissecting embryos can cause problems. Large embryos are not difficult to excise. However, small embryos require the use of micro dissection tools and a dissecting microscope to excise without injury. Embryos are easily damaged when the seed coat is cut; it is also important that the excised embryo does not become desiccated during culture (Rangan, 1984).

**Application**

Embryo culture is one of the earliest forms of in vitro culture applied to practical problems and is probably the tissue culture technique that has proven of greatest value to breeders (Dunwell, 1986).Its major application in plant breeding has been for interspecific hybridization. Many unsuccessful crosses result from embryo abortion. Early embryo abortion occurs primarily because the endosperm fails to develop properly (Hu and Wang, 1986). With interspecific crosses, intergeneric crosses, and crosses between diploids and tetrapod's, the often develops poorly or not at all. By aseptically culturing the embryo in a nutrient medium, this problem may be overcome. Embryos of some nonviable hybrids may possess the potential for initiating development by avoiding post zygotic barriers within the mother plant. Several successful cases have been documented with embryos arising from interspecific hybrids and intergeneric hybrids (Ramming, 1990; Sharma and Gill, 1983; Williams, 1980; Williams and De Lautour, 1980; Williams et al., 1982). Embryo culture can shorten the breeding cycle by overcoming dormancy in seeds. Dormancy may be caused by endogenous inhibitors, light requirements, low temperatures, dry storage requirements, and embryo immaturity (Yeung et al., 1981). Seed dormancy factors may be localized in the seed coat, the endosperm, or both. By removing the embryos from the influences of these factors, the embryos germinate and grow quickly and the breeding cycle is shortened. Isolated embryos can also be vernalized and may, in some instances, reduce the generation time by 40 days (Sharma and Gill, 1983). In addition to the applied uses of embryo culture, the procedure is useful in basic studies. Growing embryos outside the ovule (ex ovulo) is an excellent way to study the nutrition and metabolism of the embryos at various stages of development. The technique can also be used to examine the growth requirements of embryos, the effects of phytohormones and environmental conditions on zygotic embryogenesis, and the regeneration potentials of whole embryos and their segments (Yeung et al., 1981). Embryo culture can be used to localize sites of germination promoters and inhibitors, for studies of

embryogenesis, and for cryopreservation (Grout, 1986). Embryo culture can be used to produce haploids through eliminating chromosomes following distant hybridization. This can occur by rescuing haploid maternal embryos in which the paternal chromosomes have been eliminated. In these situations, fertilization occurs, but the pollen parent chromosomes are subsequently eliminated by the seed parent. The viability of the haploid embryo can only be achieved through embryo culture. Chromosome doubling of the rescued embryo produces a homozygote monoploid.

Table 1: A selected list of distant plant species crossed and the resistance traits developed through embryo rescue technique

| **Distant plant species crossed** | **Resistance trait(s)** |
|---|---|
| *Oryza sativa* X *O. minuta* | Bacterial blight and blast |
| *Solanum tuberosum* X *S.etuberosum* | Potato leal roll virus |
| *Solanum melanogena* X *S. khasianum* | Brinjal shoot and fruit borer |
| *Brassica napus* X *B.oleracea* | Cabbage aphid |
| *Lycopersicon esculentum* X *L.peruvianum* | Virus, fungi and nematodes |
| *Hordeum sativum* X *H.vulgare* | Powery mildew and spot blotch |
| *Triticam aestivum* X *Thinopyrum scirpeum* | Salt tolerance |

## Conclusion

Embryo culture is a useful technique to study the effects of nutrients, plant growth regulators and other chemical and physical factors on embryonal growth and differentiation. In addition, hybrids between species and genera can be obtained by developing plants from immature embryos of forest species, garden plants, and forest species, as agronomically. Thus, the application area of biotechnological methods in the improvement of products is significantly expanded. Overcoming seed dormancy in some species is also accomplished with this technique.

## References

Bhojwani SS, Razdan MK 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, 194p.

Collins GB, Grosser JW 1984. Culture of embryos. In: Vasil, IK (ed). Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol. 1. Laboratory procedures and their applications. Orlando, FL; Academic Press; 241–257.

Dieterich K 1924. Über Kultur von Embryonen ausserhalb des Samens. Flora 117:379–417.

Dunwell JM 1986. Pollen Ovule and embryo culture. astools in plant breeding. In: Withers LA, Alderson PG (eds). Plant tissue culture and its agricultural applications. Butter worths. London. pp 375–404.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima O 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Experimental Cell Research 50:151-158.

Grout BWW 1986. Embryo culture and cryopreservation for the conservation of genetic resources of species with recalcitrant seed. In: Withers LA, Alderson PG (eds.). Plant tissue culture and its agricultural applications. Butterworths, London, p. 303–309.

Hannig EE 1904. Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. A. Felix.

Hu CY, Wang PJ 1986. Embryo culture: technique and application. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PB (eds) Handbook of plant cell culture, vol 4. Macmillan, New York, pp 43–96.

Monnier M 1976. Culture in vitro de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* Moench (L). Rev Cytol Biol Veg 39: 1–120.

Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.

Narayanaswami S, Norstog K 1964. Plant embryo culture. Bot. Rev. 30:587–628.

Norstog K 1979. Embryo culture as a tool in the study of comparative and developmental morphology. In: Sharp WR et al. (eds) Plant cell and tissue culture: principles and applications. Ohio State University Press, Columbus, OH, pp 179–202.

Pierik RLM 1987. In vitro culture of higher plants. Handbook. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 344 p.

Raghavan V 1966. Nutrition growth and morphogenesis of plant embryos. Biol. Rev. 41:1–58.

Raghavan V 1980. Embryo culture. In: Vasil IK, ed. Perspectives in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11B. New York: Academic Press; 209–240.

Rangan TS 1984. Clonal propagation: Somatic embryos of Citrus. In: Vasil IK (Ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Acad Press Inc, Orlando, pp 68–73.

Ramming DW (1990) The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25:393–39

Sezgin M, Kahya M 2018. Phytohormones, Journal of science and technology 8(1): 35-39.

Sharma HC, Gill BS (1983) Current status of wide hybridization in wheat. Euphytica 32:17–31

Williams, R. 1980. Problems in materialism and culture: Selected essays. Verso.

Williams EG, De Lautour G 1980. The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interspecific hybrids in pasture legumes. Botanical gazette, 141(3): 252-257.

Williams EG, Ramm-Anderson S, Dumas C, Mau S-L, Clarke AE 1982. The effect of isolated components of Prunus avium L. styles on in vitro growth of pollen tubes. Planta. Planta. 156:517-519.

Williams ME 2011. Introduction to phytohormones. Teaching Tools in Plant Biology: Lecture Notes. The Plant Cell (online), doi/10.1105/ tpc. 110.tt0310.

Yeung EC, Thorpe TA, Jensen CJ 1981. In vitro fertilization and embryo culture,. In: Thorpe TA (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic, New York. p. 253–271.

# Nonspecific and Substrate Affinity Immobilization of Pectinases from Model Mixture on Magnetic Support

Nihal YILMAZ, Suzan BİRAN AY*, Emir Zafer HOŞGÜN

*Eskisehir Technical University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, 26555, Eskisehir, Turkey.

*Corresponding author email: suzanba@eskisehir.edu.tr

**Abstract**

In this study, the effect of surface characteristics of support on adsorptive immobilization of proteins was investigated. Specifically, a comparative study on pectinase immobilization using non-modified and pectin coated magnetic nanoparticles as a support was conducted. Initially, magnetic nanoparticles were synthesized by co-precipitation method under inert atmosphere at room temperature. The pectin coated magnetic nanoparticles were produced under the same conditions by simultaneous synthesis-coating in the presence of 0.5% w/v pectin solution. Magnetic nanoparticles were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Thermogravimetric analysis (TGA). Fungal pectinase and Bovine Serum Albumin (BSA) were used individually and in combination as model proteins in immobilization studies. The effect of surface functionalization of the support (non-modified and pectin-coated magnetic particles) at different pH (2.33, 3.00, 3.50, and 4.00) conditions was investigated. Protein concentration was measured by Bradford Assay. Pectinase activity was estimated by monitoring the increase of reducing sugar concentration by DNSA method. Immobilization efficiency was calculated based on protein loading and pectinase activity of magnetic particles. A model mixture containing the enzyme and BSA was used for selective immobilization of pectinases on naked and substrate coated magnetic nanoparticles at pH=3.5 and 1 h immobilization time. Protein loading yields on pectin coated magnetic nanoparticles and magnetic nanoparticles were determined as 61.76% and 98.03%, respectively. The immobilization of enzyme resulted in significant increase in specific activity (free 9.45 U/mg) for both non-modified and modified magnetic support. Utilization of substrate affinity during immobilization improved the specific activity three folds (29.86 U/mg) while nonspecific immobilization resulted in two folds (19.56 U/mg) increase.

**Keywords:** Magnetic support, Pectin coated magnetic particles, Pectinase, Immobilization, Substrate affinity

## INTRODUCTION

Enzymes are biological catalysts that accelerate the chemical reactions and they play key roles in many industrial applications. Pectinases are used in various industrial processes such as water treatment, fruit juice extraction, coffee and tea fermentation and paper bleaching (Jayani et al., 2005). In enzymatic reactions, a major challenge is the low enzyme recovery and limited re-use of the catalyst. These problems can be overcome by using immobilized enzymes, hereby decreasing the overall cost of the process (Lee et al., 2007). Immobilization of enzymes on a support can be accomplished by covalent and ionic bonding, adsorption, entrapment and encapsulation (Murty et al., 2002).

In recent years, magnetic nanoparticles have been extensively studied because of their utilization potential in biotechnological applications, especially biomedical and protein/enzyme immobilization (Hong et al., 2008). Several methods such as co-precipitation, micro emulsion, thermal decomposition and hydrothermal synthesis have been used for the synthesis of magnetic nanoparticles. Among all these methods, co-precipitation is reported as a highly convenient technique to synthesize magnetic nanoparticles (Lu et al., 2002). To protect these magnetic nanoparticles from oxidation and agglomeration, various surface modification methods such as functionalization or coating are employed (Faraji et al.,2010). The properties of coating materials are especially important in enzyme immobilization applications, because the coating serves as an interface between enzyme and support. With a proper surface coating, biomolecules can link to the magnetic nanoparticles via electrostatic, hydrophobic and affinity bonding (Lee et al., 2009). Previous studies have reported the effectiveness of immobilization adsorption with coating surfactants (Bahrami and Hejazi, 2013). Adsorption is the simplest method involves electrostatic or ionic interactions between biomolecule and support. These interactions are supplied with a charged biomolecule and opposite charged support. Because of

enzymes are zwitter ion, immobilizing or releasing of proteins can be efficiently sustained by changing medium pH (Fatima and Kim, 2016). This means that, positively charged enzyme can be immobilized on and released from negatively charged magnetic nanoparticles through the pH modification.
In the present study, iron oxide magnetic nanoparticles were synthesized by co-precipitation method using a mixture of ferric and ferrous ions in alkaline solution. Synthesized magnetic nanoparticles were further coated with pectin and both non-modified and pectin-coated magnetic particles were characterized with different methods. Pectin as an anionic surfactant also a substrate of pectinase. The effects of three factors such as solution pH, immobilization time and support surface characteristics on immobilization of bovine serum albumin (BSA) and *Aspergillus niger* pectinase were investigated. Then, selective immobilization of pectinases from model mixture, containing the enzyme and BSA, on naked and substrate-coated magnetic nanoparticle was studied. The enzyme activity and specific activity of the immobilized enzyme were compared with that of the free enzyme.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Pectinase from *Aspergillus niger*, pectin from apple and D-(+)-galacturonic acid monohydrate, Bovine Serum Albumin (BSA), sodium hydroxide (NaOH) were obtained from Sigma Aldrich. Ferric chloride hexa hydrate ($FeCl_3.6H_2O$) and ferrous chloride tetra hydrate ($FeCl_2.4H_2O$) were purchased from Merck (Germany). The distilled water was used throughout the experimental studies. All the chemicals used were of analytical grade and of highest purity.

### Synthesis of magnetic nanoparticles

Magnetite nanoparticles were synthesized by co-precipitation of $FeCl_2.4H_2O$ and $FeCl_3.6H_2O$ (molar ratio,1:2) in distilled water using NaOH. Briefly, at room temperature 1.992 g $FeCl_2.4H_2O$ and 5.412 g $FeCl_3.6H_2O$ were dissolved in 40 mL distilled water, individually. Then, 10 mL $FeCl_2.4H_2O$ solution and 10 mL $FeCl_3.6H_2O$ solution were mixed. After that 20 mL of 2 M NaOH solution was added dropwisely to the solution under vigorous stirring in the presence of $N_2$. The dispersion was stirred for 30 min and the solution turned black in color. The black precipitate was washed with distilled water several times, until the solution pH was neutral. Then, the black precipitate was decanted with using magnet (Fig. 1) and dried in vacuum oven at 40°C.



**Figure 1.** Synthesized Magnetic Nanoparticles (Naked)

### Synthesis of pectin coated magnetic nanoparticles

The pectin coated magnetic nanoparticles were synthesized by simultaneous synthesis-coating in the presence of 0.5% w/v pectin solution. Firstly, pectin solution was prepared by dissolving 0.5 g pectin from apple in 100 mL distilled water with continuous stirring for 24 h at room temperature. Secondly, 10 mL of each prepared $FeCl_2.4H_2O$ and $FeCl_3.6H_2O$ solutions were mixed homogenously and then pectin solution was added to dispersion drop by drop. 20 mL 2M NaOH was added dropwisely to the mixture under vigorous stirring in the presence of $N_2$ and left for 30 min. Solution turned black and the black precipitate was washed with distilled water several times, until the solution pH was neutral. Then, the black precipitate was separated again using magnet and dried in vacuum oven at 40°C.

**Characterization of magnetic nanoparticles**

FT-IR and TGA analyses of pectin coated magnetic nanoparticle and magnetic nanoparticles were done to investigate the properties. The FT-IR spectrum were recorded on FTIR spectrophotometer (IRTracer-100, Shimadzu, Japan). The spectrum of nanoparticles was taken from 400 $cm^{-1}$ to 4800 $cm^{-1}$. For FTIR analysis of synthesized silver nanoparticles and plant extract, silver nanoparticles and plant extract were dried in vacuum drying oven (VD 23, Binder, Germany) at 45°C for 2 days. And small amount of magnetic nanoparticles (1% of 0.1 g KBr and sample mixture) was mixed with KBr powder (Sigma Aldrich, Germany) to form a pellet for FTIR measurements. Thermogravimetric analysis of nanoparticles was done using TG Analyzer (TGA 4000, Perkin Elmer, USA). The analysis was carried out from 30°C to 600°C at a heating rate of 20°C/min under the flow of nitrogen gas.

**Pectinase immobilization**

0.01 g of synthesized nanomagnetic supports (modified and nonmodified) were added to 1 mL pectinase solution (10 mg/mL in 0.1 M acetate buffer at pH 2.33, 3.00, 3.50, and 4.00) and 1 mL BSA solutions (1 mg/mL in 0.1 M acetate buffer at pH 2.33, 3.00, 3.50, and 4.00) and sonicated for 20 min or 1 h. Then, nanoparticles were decanted with permanent magnet and washed twice with acetate buffer at corresponding pH. The supernatants of washed nanoparticles were collected after each wash and assayed for protein content using Bradford analysis (Bradford, 1976). The same procedure was conducted at pH 3.50 and 1 h immobilization time for the model mixture which contained equal volumes of pectinase (10 mg/mL) and BSA (1 mg/mL).

**Bradford protein assay**

The protein content of samples was measured by Bradford method (Bradford, 1976). Shortly, 500 µL appropriately diluted pectinase (or BSA) solution was mixed with 1 mL Bradford solution and after 10 min the solution absorbance was measured at 595nm in UV-vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The protein content was calculated from established protein standard curve constructed with bovine serum albumin (BSA) solution (0.005-0.05 mg BSA/mL). Each reported measurement is an average of a triple analysis.

The amount of immobilized protein was quantified by measuring the protein content of the initial solution before and after immobilization, and the total protein content in the three wash solutions following immobilization. The amount of immobilized protein was calculated according to equation 1:

$$Mass_{immob.} = mass_{initial\ soln} - mass_{final\ soln} - mass_{washing\ solns} \quad (1)$$

Accordingly, the % immobilization yield was calculated using equation 2, where the total protein load was found by equation 1:

$$\%\ immobilization\ yield = \frac{Total\ protein\ loaded\ on\ magnetic\ support\ (mg)}{Total\ protein\ in\ initial\ solution\ (mg)} \times 100 \quad (2)$$

**Pectinase activity assay**

Immobilized and free pectinase activities were estimated by monitoring the increase of reducing sugar concentration during the hydrolysis of 1% (w/v) apple pectin in 0.1 M acetate buffer at pH 4.00 by3,5-dinitrosalicyclic acid (DNS) method (Miller, 1959). The standard compound used for the calibration curve was D-(+) galacturonic acid monohydrate. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µmol galacturonic acid per mL per min under the described conditions. The results were reported as specific activity, which is defined as catalytic activity per mg of protein (equation 3):

$$Specific\ activity\ \left(U/mg\right) = Enzyme\ activity\ (U)/mg\ protein \quad (3)$$

All experiments were done in duplicates and the average values were reported.

**RESULTS and DISCUSSION**

**Characterization of magnetic nanoparticles**

The Fourier transform infrared spectroscopy analyses confirmed the pectin-coating and surface functionalization of magnetite nanoparticles (Fig.2). The FTIR spectrum of pectin (Fig.2- spectrum A) shows characteristic peaks at 3444, 2928, 1711 $cm^{-1}$. These peaks correspond to secondary hydroxyl groups,

carboxylic hydroxyl groups and carbonyl stretching vibrations of ester groups, respectively. The peak at 1203 $cm^{-1}$ can be caused by the bending vibrations of C–O and -O- (Gong et al. 2012). Also, the peak at 1020 $cm^{-1}$ results from the vibration of the glycosidic bond linking two galacturonic acid sugar units and is lowered in intensity in the pectin-coated MNPs samples (Namanga et al. 2013). Fig.2 spectra B and C display the FTIR spectra of pectin coated magnetic nanoparticles and uncoated magnetic nanoparticles, respectively. The peaks at around 800-850 $cm^{-1}$ in both uncoated and pectin-coated MNPs represent the Fe-O-Fe stretching vibration (Baby and Ramaprabhu 2010). In addition, the peaks at approx. 550 $cm^{-1}$ corresponded to the vibration of the Fe-O bonds (Lobato et al., 2017), which are absent in the pectin spectra (A). On the other hand, additional peaks appeared after pectin coating to magnetic particles. The peak located at 1014 $cm^{-1}$ is due to the stretching vibration of C-OH of alcoholic groups and carboxylic acids and the vibrations associated with the skeletal rings of pectin sugar monomers (Gong et al. 2012). The absorption peaks at ≈1400 $cm^{-1}$ are assigned to the Fe–O stretching vibration and symmetric and asymmetric COO-Fe interaction in the formed pectin coated MNP samples (Quy et al. 2013). Also, the C-O stretches in free carboxylic acid are designated by the peak at 1716 cm−1 (Liu et al. 2008). And the absorption peak at 3535 $cm^{-1}$ corresponds to hydroxyl group stretching vibrations (Liang et al. 2010). Thus, it can be confirmed that pectin was successfully coated on the surface of magnetic nanoparticles via interaction between carboxylic group of pectin and the $Fe^{+3}$ and $Fe^{+2}$ ions of $Fe_3O_4$ (magnetite) particles (Attallah et al. 2018).

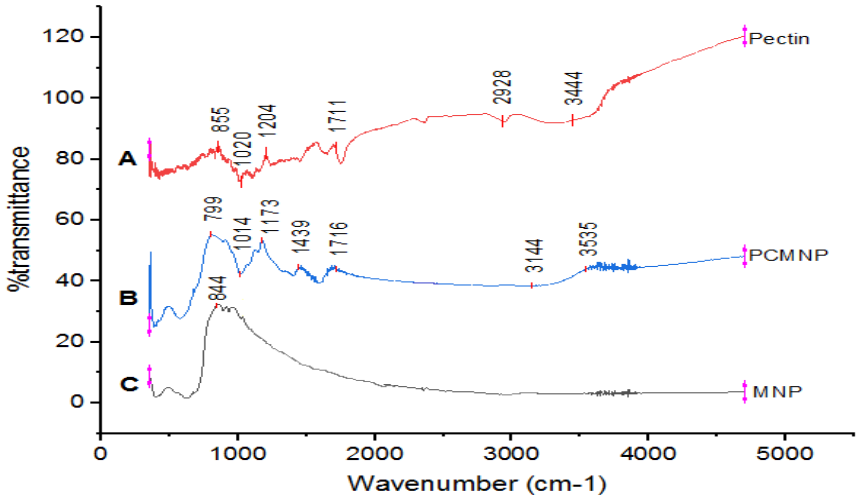



**Figure 2.** FTIR Spectrum of (A) Pectin, (B) Pectin Coated Magnetic Nanoparticle, (C) Uncoated Magnetic Nanoparticle

Unmodified magnetic nanoparticles, pectin coated magnetic nanoparticles and pectin were analyzed by thermogravimetric analysis (TGA) to determine polymer and magnetite percent. The thermogram of the uncoated magnetic nanoparticles (Fig 3.a) showed a slight change in weight as temperature increased from 30 to 600°C. Heating the unmodified magnetic nanoparticles resulted in about 3.76% weight loss in this range . However, pectin coated magnetic nanoparticles exhibited a noticeable weight decrease with increasing temperature (Fig 3.b). In the range of 25-100°C, weight loss of approximately 5% was observed and this was related to the evaporation of the physically adsorbed water in the sample. TGA of pectin alone (Fig 3.c) showed a significant weight decrease between 200-400°C and pectin-coated magnetic nanoparticles demonstrated a similar decline in the same temperature range. This decrease denotes to the thermal degradation of pectin coating on the magnetic nanoparticles (Bai et al. 2011). The total weight loss in pectin coated magnetic nanoparticles was 25.44%. 3.76% of this weight loss was due to magnetite and 21.68% due to the combustion of pectin. Therefore, the findings suggested that the content of pectin is about 21.68% and the magnetite content is about 78.32%. These results demonstrated that the magnetic nanoparticles have been coated by pectin successfully.

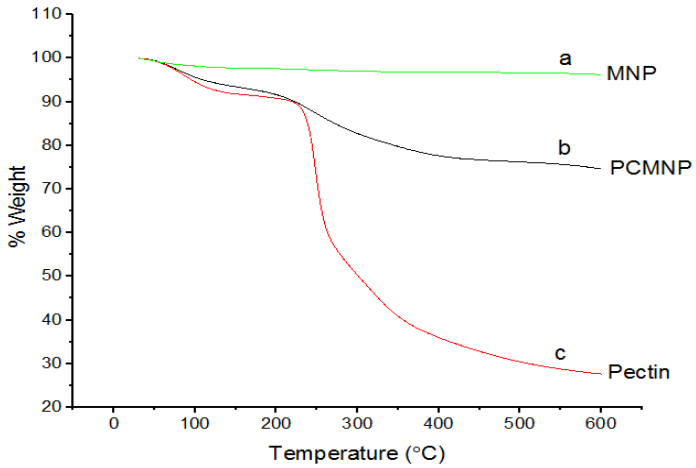



**Figure 3.** Thermogravimetric analysis of (a) Uncoated Magnetic Nanoparticle, (b) Pectin Coated Magnetic Nanoparticle, (c) Pectin

**Pectinase Immobilization on Uncoated Magnetic Nanoparticles and Pectin-Coated Magnetic Nanoparticles**

Effect of various pH values (2.33, 3.00, 3.50, 4.00) and bonding force (nonspecific and substrate affinity) on immobilization of proteins on magnetic support was tested by using fungal pectinase and Bovine Serum Albumin (BSA). Percent immobilization yields of BSA and pectinase on uncoated (MNP) and pectin-coated magnetic nanoparticles (PCMNP) are shown in Fig 4.a,b.

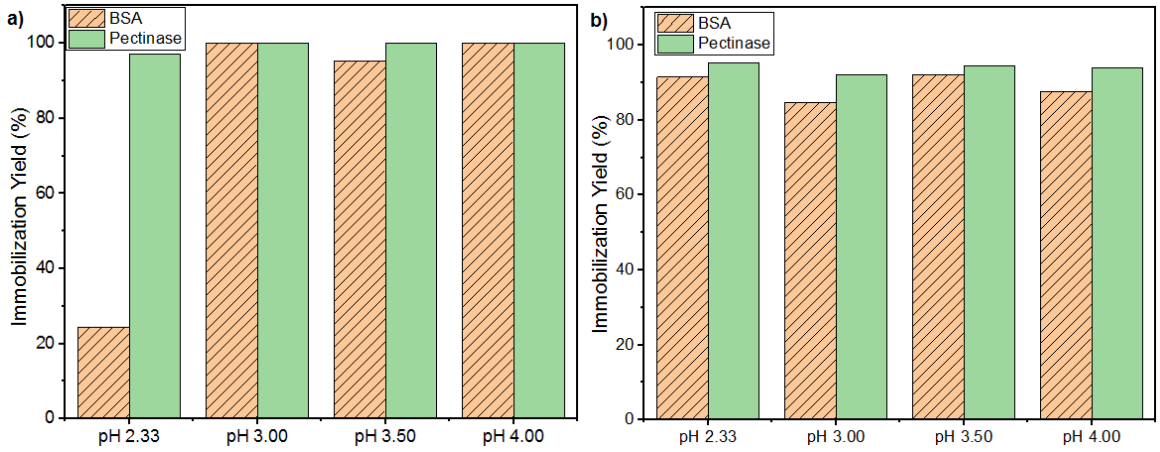



**Figure 4.** Immobilization yield of BSA and pectinase on uncoated (MNP) (a) and pectin-coated magnetic nanoparticles (PCMNP) (b)

As it is known, proteins in solutions with pH below their isoelectric points (pI) have net positive charge, whereas in solutions with pH above pI the net charge is negative. BSA having pI=4.7, would possess net positive charge in all the studied solutions. Therefore, studies with BSA were focused on the effect of surface modification of the support. Pectin is an anionic surfactant that provides negative charge on the magnetic nanoparticles; therefore, PCMNP were expected to adsorb BSA significantly due to electrostatic attraction. However, the results demonstrated that uncoated magnetic particles were more effective in immobilization of the protein, whereas pectin coated particles resulted in about 20% lower loading. Only the MNP at pH=2.33 exhibited a substantial low immobilization (24% immobilization yield), which might be attributed to the previously reported hydrolyzing and denaturating effect of acidic environment (pH=2) on the BSA (Estey et al., 2006). Pectinase, on the other hand, has a pI of 3.8; so, the enzyme was expected to be negatively charged at pH=4 and positively charged at the other solutions. Independently of enzyme net surface charge, the immobilization on MNP was achieved with almost 100% efficiency (Fig. 1a). In PCMNP, the yield slightly decreased by 10%. Despite the expected repulsion between the negatively charged pectin and negatively charged pectinase at pH=4, the effect of this electrostatic repulsion was not reflected on immobilization yield. This observed behaviour showed that, adsorption of pectinase on pectin coated magnetic nanoparticle is related not only by electrostatic interactions but also by substrate affinity interaction.

A solution containing pectinase and BSA was used as a model mixture, where the selective immobilization of the enzyme on non-functionalized and substrate-coated support material was investigated. Immobilization pH was selected as 3.5, since both BSA and pectinase had comparably high immobilization yields. Protein contents of pectin coated magnetic nanoparticles and naked magnetic nanoparticles are tabulated in Table 1. After the calculations protein immobilization yields of pectin coated magnetic nanoparticle and magnetic nanoparticle were determined as 61.76% and 98.03%, respectively. The high protein load on magnetic nanoparticles might be related to the adsorption of not only the enzyme but also BSA. In earlier studies (Bahrami and Hejazi, 2013), it was found that enzyme specific activity only depends on the immobilized enzyme amount. Therefore, enzyme activities and specific activities of the nanoparticle after immobilization were calculated to determine qualitatively how much of the immobilized proteins were pectinase. The immobilization of enzyme resulted in remarkable increase in specific activity for both non-modified (19.56 U/mg) and modified magnetic support (Fig. 5). Utilization of substrate affinity during immobilization improved the specific activity three folds while nonspecific immobilization resulted in two folds increase. Thus, selective immobilization of pectinase from model mixture can be done successfully with substrate coated magnetic nanoparticles.

**Table 1.** Protein contents and enzyme activities of enzyme

| Enzyme | Protein Content (mg protein/ g support) | Enzyme Activity (U/g support) |
|---|---|---|
| Free | 0.232* | 2.192** |
| MNP | 4.54 | 88.8 |
| PCMNP | 6.66 | 198.8 |

*(*Protein content of free enzyme in mg protein / mL)*

*(**Activity of free enzyme in U / mL)*

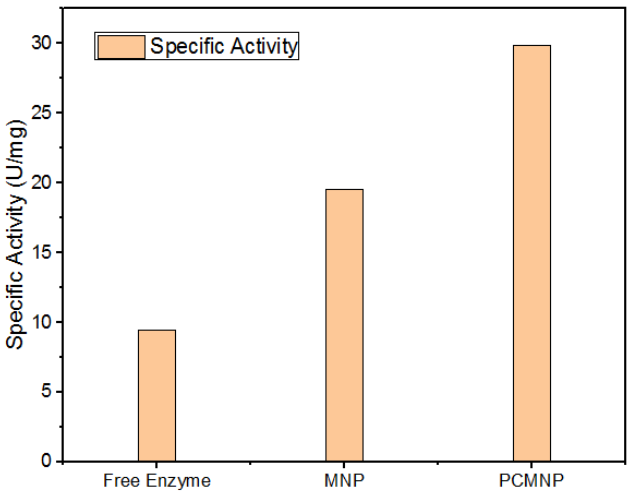



**Figure 5.** Specific activity of pectinase

## CONCLUSION

In this study, naked and surface-modified magnetic nanoparticles were synthesized via co-precipitation method. The magnetic support was coated with pectin, a substrate for the model enzyme. An inert protein, BSA, and an enzyme, pectinase, were used for investigation of the effect of physical interaction between the support and the immobilized protein. BSA and pectinase were successfully immobilized on pectin coated magnetic nanoparticles and nonfunctionalized magnetic nanoparticles with significantly high yields. The effect of solution pH was not substantial. Electrostatic and substrate affinity interactions played role in the immobilization of the enzyme. Independently of the surface modification, immobilization of the enzyme resulted in enhanced activity and increased specific activity, two folds for MNP and 3 folds for PCMNP. Consequently, using this immobilization strategy proves to be simple, economic and promising method in efficient biocatalyst adsorption on magnetic supports.

## REFERENCES

Attallah OA, Al-ghobashy MA, Nebsen M 2018. Assessment of pectin-coated magnetite nanoparticles in low-energy water desalination applications. Environ Sci Pollut Res 25:18476–18483. Available at: https://doi.org/10.1007/s11356-018-2060-9 [30.03.20]

Baby TT, Ramaprabhu S 2010. $SiO_2$ coated $Fe_3O_4$ magnetic nanoparticle dispersed multiwalled carbon nanotubes based amperometric glucose biosensor. Talanta 80(5):2016–2022. Available at: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.010 [31.03.20]

Bahrami A, Hejazi P 2013. Electrostatic immobilization of pectinase on negatively charged AOT-Fe3O4 nanoparticles. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic *93*: 1–7

Bai H, Liu Z, Sun DD 2011 Highly water soluble and recovered dextran coated $Fe_3O_4$ magnetic nanoparticles for brackish water desalination. Sep Purif Technol 81(3):392–399. Available at: https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.08.007 [02.04.20]

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Estey T, Kang J, Schwendeman SP, Carpenter JF 2006. BSA Degradation Under Acidic Conditions: A Model For Protein Instability During Release From PLGA Delivery Systems, Journal of Pharmaceutical Sciences, 95 (7), 626-1639.

Faraji M, Yamini Y, Tewari R 2010. Magnetic nanoparticle: Synthesis, stabilization, functionalization, characterization and applications. J. Iran. Chem. Soc. 7: 1–37

Fatima H and Kim KS 2017. Magnetic nanoparticles for bioseparation. Korean J. Chem. Eng., 34(3), 589-599. Available at: 10.1007/s11814-016-0349-2 [04.04.20]

Gong JL, Wang XY, Zeng GM, Chen L, Deng JH, Zhang XR, Niu QY 2012. Copper (II) removal by pectin–iron oxide magnetic nano-composite adsorbent. Chem Eng J, 185-186:100–107. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.01.050 [30.03.20]

Hong RY, Li JH, Li HZ, Ding J, Zheng Y, Wei DG 2008. Synthesis of Fe3O4 nanoparticles without inert gas protection used as procursors of magnetic fluids. J. Magn. Magn. Mater. 320: 1605–1614.

Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochem, 40(9):2931-2944. Available at: 10.1016/j.procbio.2005.03.026 [04.04.20]

*Lee DG, Ponvel KM, Kim M, Hwang S, Ahn* IK, *Lee CH 2009*. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetic nanoparticle. *J Mol Catal B Enzym 57*:*62–66*.

Lee SH, Doan TTN, Ha SH, Koo YM 2007. Using ionic liquids to stabilize lipase within sol-gel derived silica. J Mol Catal. B: Enzym. 45 (2007) 57–61.

Liang S, Guo X, Feng N, Tian Q 2010. Isotherms, kinetics and thermodynamic studies of adsorption of $Cu^{2+}$ from aqueous solutions by $Mg^{2+}/K^{+}$ type orange peel adsorbents. J Hazard Mater 174(1–3): 756–762. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.116 [31.03.20]

Liu J, Zhao Z, Jiang G 2008. Coating $Fe_3O_4$ magnetic nanoparticles with humic acid for high efficient removal of heavy metals in water. Environ Sci Technol 42(18) :6949–6954. Available at: https://doi.org/10.1021/es800924c [31.03.20]

Lu Y, Yin Y, Mayers BT, Xia Y 2002. Modifying the surface properties of iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach. Nano Lett. 2:183–186.

Miller GL 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry,31(3): 426-428.

Murty VR, Bhat J, Munisvaran PKA 2002, Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. *Biotechnol. Bioprocess Eng. 7, 57–66*. Available at: https://doi.org/10.1007/BF02935881 [02.04.20]

Namanga J, Foba J, Ndinteh DT 2013. Synthesis and magnetic properties of a superparamagnetic nanocomposite. Pectin-MagnNanocompos 2013:87.

Quy DV, Hieu NM, Nam NH, Nguyen HH 2013. Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses. J Nanomater 9:1–6. Available at: https://doi.org/10.1155/2013/603940 [31.03.20]

Shamim N, Hong L, Hidajat K, Uddin MS, Colloid J 2006. Thermosensitive-polymer-coated magnetic nanoparticles: Adsorption and desorption of Bovine Serum Albumin. J Colloid Interface 304(1):1-8. Available at: 10.1016/j.jcis.2006.08.047 [04.04.20]

# Application of Low-Pressure to Bake Gluten-Free Cake

Sezin Tuta Şimşek[1*]

[*1] Çankırı Karatekin University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Çankırı, Turkey.

*sezintuta@karatekin.edu.tr

**Abstract**

Cereal products are an important part of the daily diet; however, these can lead to some health issues for some people due to containing gluten. Gluten has positive effects on the technological properties of cereal products; however, it has some negative effects on human health as celiac disease and gluten intolerance. Therefore, the gluten-free food market has developed and R&D investments have increased in the food sector recently. The cake is one of the most important cereal products because of the high consumption rate due to its flavor, texture and mostly preferred by children. Lack of gluten causes undesired technological properties of cake such as low volume, pale color, crumble crust which is a problem both for consumers and producers. Vacuum technologies have been one of the novel technologies studied recently due to its advantages. Even though vacuum cooling, frying have been encountered in the literature, a limited number of studies have been observed in baking, especially for gluten-free products. In this study, physical (homogeneity, symmetry and volume indexes) and sensorial properties of gluten-free cake were explored by comparing low-pressure baking and traditional methods (control). Similar physical properties were observed for control and low-pressure baked cake samples and these differences were statistically negligible ($p>0.05$). Sensorial results showed that change in color and collapsing of partial-vacuum baked samples were statistically important ($p<0.05$) and other properties (appearance, hardness, stickiness, overall acceptability) were comparable ($p>0.05$). This study showed that gluten-free cake with desired physical and sensorial properties can be achieved by using low-pressure baking.

**Keywords:** gluten-free, baking, vacuum

## INTRODUCTION

Baking is one of the unit operations used for processing bakery products, physical and chemical changes occur during this process. Temperature, time and pressure are the main parameters for baking (Rondeu-Mouro et al. 2018). Conventional baking is carried out at atmospheric pressure, heat transfer mechanisms are conduction, convection, and radiation. At the beginning of baking, batter temperature increases from outside to inside and the formation of temperature and moisture gradients occur (Deleu et al. 2019). As a result of these changes, cake hardening occurs by starch gelatinization and protein denaturation. Alternative baking methods have been developed recently due to the consumers' increasing demand for healthy and high-quality products and the low-pressure heat treatment is one of the methods studied for this purpose. Low-pressure baking is carried out in a vacuum oven, and reducing pressure lowers the boiling point of water, changes gas expansion and gas dissolving degree (Rondeu-Mouro et al. 2018). Faster evaporation occurs due to an increase in the pressure difference between ambient pressure and the inner pressure of the product. Hence, mass transfer accelerates, and temperature and moisture gradient differentiate from conventional methods. This causes different product characteristics to be obtained, unlike the conventional method. There are many studies about the impact of vacuum baking on the improvement of aeration characteristic of bread (Grenier et al. 2019); enhancement of physical and storage properties of gluten-free bakery products (Tuta Şimşek 2020; Tuta Şimşek 2019); reducing acrylamide level of the cookie with desirable quality properties (Palazoğlu et al. 2015). These studies showed that low-pressure baking is a prominent technology to enhance the quality and chemical properties of food products.

Celiac disease or gluten-sensitive enteropathy, which is a gluten-induced disease, is an immune disorder. The only treatment for celiac disease is a lifelong gluten-free diet, for this reason, the development of new gluten-free products and new baking methods have gained importance (Kondolot et al. 2009). Grain products without gluten are produced by using rice, corn flour mostly and those products have crumble structure, light color, fast staling rate. Improving these properties especially without using additives are a challenge for food

producers. The cake is one of the cereal product that has importance for the bakery industry and popular food due to being quick snack with desirable taste and texture. The presence of high amounts of sugar and fat in the cake dough causes a weaker gluten network structure than bread dough, but gluten still plays an important role in the desired volume and texture (Majzoobi et al. 2016). In this study, the low-pressure baking effect on the sensorial and physical properties of the gluten-free cake was assessed. A sensorial analysis is important to understand the psychological perception of food products. Perception of rheological properties of food products in mouth differentiates from instrumental methods due to mouthfeel between palate and tongue (Villavicencio et al. 2007). The sensory analysis involves the use of smell, taste, sound and tactile sensation. It involves touching the food tissue with the fingertips as well as the use of the lips, tongue, palate, and teeth. Sensory analysis methods are subject to wide variability, but this variability can be reduced using trained evaluators (Van Biesen et al. 2010). As a whole, gluten-free products had similar physical properties according to gluten equivalents but generally failed in sensorial properties. Therefore, in the current study low-pressure baking method was evaluated in terms of sensorial and physical properties.

## MATERIALS AND METHODS

### Baking methodology

The experimental flow diagram was shown in Figure 1 (Turabi et al. 2008, Tuta Şimşek 2019). Low-pressure baking was carried out partially and the baking procedure was determined by optimization of baking temperature-time in a conventional oven and vacuum oven as described in Tuta Şimşek (2019). Physical, sensorial properties were analyzed after 1 h from baking.

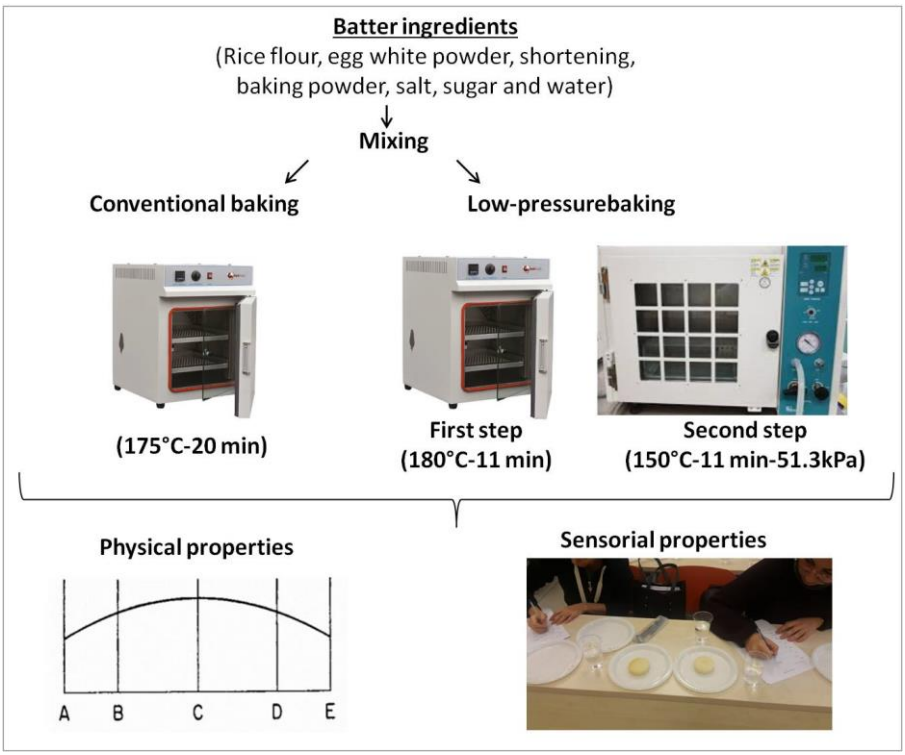



Figure 1. Experimental flow diagram (Turabi et al. 2008, Tuta Şimşek 2019)

**Determination of Physical Properties**

Physical properties were determined according to AACC 10-91 in terms of homogeneity, symmetry and volume indexes of gluten-free cake samples. The cake samples cut into two parts and dimensions of A, B, C, D, E were measured by using millimetric paper to calculate these indexes (Eq. 1, 2, 3, 4) (Turabi et al. 2008; Dizlek et al. 2008).

Total volume index (mm) = A + B + C + D + E (1)

Volume Index (mm) = B + C + D (2)

Symmetry index (mm) = 2 x C - B - D (3)

Homogeneity index (mm)= B – D (4)

where A and E are corner heights of cakes (mm); C is height at the center point (mm); B and D are equidistant height from the right and left of the center of cake (mm).

**Sensorial Analysis**

The sensorial analysis was done by a 9-point test to compare control and low-pressure baked gluten-free cake samples. Sixteen semi-trained panelists were students from Çankırı Karatekin University and panelists were trained before the panel. Panelists rated the appearance, color, texture ( hardness, stickiness), collapsing and overall acceptability of cake samples (Tsatsaragkou et al. 2015).

**Statistical Analysis**

All analyzes were done with two replicates with two repeats. Statistical differences between sensorial and physical properties of control and low-pressure baked samples were analyzed by paired-t-test (p = 0.95, Microsoft Excel, 2007).

**RESULTS and DISCUSSION**

Physical properties (total volume index, volume index, homogeneity index, symmetry index) of control and low-pressure baked samples are shown in Table 1. Differences between all physical properties control and low-pressure baked samples were statistically insignificant ($p>0.05$). Total volume index and volume index values of control and low-pressure baked samples were similar. The homogeneity index informs about cross-section symmetry of cake samples and these values were comparable for cake samples prepared with both methods. Collapsing is important physical properties especially for low-pressure baked samples and the symmetry index is a measure of the collapsing degree of cake samples. Negative and positive symmetry index values mean collapsing and swelling occurrence on the cake surface, respectively (Dizlek et al. 2008). As seen in Table 1, negative symmetry values were detected for both samples and a little collapsing occurred for those samples. Physical properties of control and low-pressure baked samples showed that low-pressure baking did not affect those values significantly and similar physical properties were obtained by both baking methods.

Table 1. Physical properties of control and low-pressure baked gluten-free cake samples.

| Properties | | Control | Low-pressure baking | p-value (α=0.95) |
|---|---|---|---|---|
| **Physical Properties** | Total volume index | 11.74±0.17 | 12.01±0.24 | 0.110 |
| | Volume index | 7.69±0.18 | 7.56±0.18 | 0.357 |
| | Homogeneity index | 0.09±0.09 | -0.01±0.03 | 0.066 |
| | Symmetry index | -0.11±0.02 | -0.14±0.05 | 0.390 |

Change in baking methods influences organoleptic acceptance by altering the physicochemical properties of food (Salehi and Aghajanzadeh 2020). According to sensorial analyzes (Table 2), appearance, hardness, stickiness and overall acceptability of gluten-free cake samples were similar and differences between them were statistically insignificant ($p>0.05$). The mean scores of appearance and overall acceptability of both samples were approximately 7 (1-dislike, 5- neither like nor dislike and 9-really like). Panelists rated these properties of products as liked. Hardness is one of the quality properties for bakery products for consumer acceptance. Hardness means the force to chew the cake between teeth. Stickiness gives information about excessive moistness and high stickiness causes the cake sticks to fingerprints and the palate during chewing (Van Biesen et al. 2010). Hardness scores of control and low-pressure baked samples were rated around 5 as

"neither hard nor soft". Adhesiveness values of control samples (rate of 3.5) were higher than low-pressure counterparts (rate of 2.5). Differences between color and collapsing values were statistically significant ($p<0.05$). Scales of sensorial properties were between 1 to 9, for color parameters 1 and 9 showed very light and very dark color, respectively. Low-pressure baked cake samples were evaluated as lighter than control counterparts. For low-pressure baking, cake samples removed to vacuum oven from conventional oven and ambient temperature and boiling point of water (at 51.3 kPa pressure) reduced (Tuta Şimşek, 2019). The lighter color of low-pressure baked samples may be related to limited color formation reactions on the surface of cake samples due to the low boiling point of water (Palazoğlu et al. 2015). Collapsing was an important quality parameter for partial low-pressure baking. Collapsing degrees were scaled 1 to 9 as no collapsing and pronounced collapsing and 5 meant collapsed vaguely. Panelists evaluated low-pressure baked samples as "vaguely collapsed" (5.69) while conventional counterparts were evaluated as "almost no collapse" (3.37) as seen in Table 2. It can be said that even if the collapse evaluations of the samples were significantly different ($p<0.05$), low-pressure baked samples were within the acceptable limits. The crumb structure of bakery products affects sensorial aspects (physical and organoleptic properties) of those samples (Salehi and Aghajanzadeh, 2020). Statistically, a significant difference was found for collapsing degree but noticeable differences were not found for hardness and adhesiveness values. This showed that collapsing did not affect the sensation of the inner structure of low-pressure cake samples. Hence, sensorial analyses showed that gluten-free cake samples were similar to control and acceptable cake samples were obtained by using a low-pressure baking process.

**Table 2**. Sensorial properties of control and low-pressure baked gluten-free cake samples.

| Properties | | Control | Low-pressure baking | p-value (α=0.95) |
|---|---|---|---|---|
| **Sensorial Analysis** | Appearance | 7.12±1.63 | 6.19±1.56 | 0.107 |
| | Color | 5.06±1.73 | 2.56±1.21 | 0.000 |
| | Collapsing | 3.37±1.36 | 5.69±2.18 | 0.002 |
| | Hardness | 4.31±1.08 | 5.12±1.20 | 0.053 |
| | Stickiness | 2.50±1.41 | 3.50±1.75 | 0.086 |
| | Overall acceptability | 7.06±1.29 | 6.75±1.18 | 0.481 |

## CONCLUSION

In this study, the sensorial and physical properties of low-pressure baked cake samples were investigated and compared with the conventional method. The physical properties of low-pressure baked gluten-free cake samples were similar to the control in terms of the volume, symmetry, uniformity, total volume indices and differences between these properties were statistically insignificant ($p>0.05$). Significant differences ($p<0.05$) between control and low-pressure baked samples were found for color and collapsing degree, lighter color, and vaguely collapsed cake samples were obtained by low-pressure baking. Differences between appearance, hardness, stickiness and overall acceptability of gluten-free cake samples were statistically insignificant ($p>0.05$). In conclusion, sensory results showed that acceptable gluten-free cake can be obtained using low-pressure baking with comparable physical properties.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by TUBITAK Project No:117O737.

## REFERENCES

Deleu LJ, Luyts A, Wilderjans E, Van Haesendonck I, Brijs K, Delcour JA 2019. Ohmic versus conventional heating for studying molecular changes during pound cake baking. Journal of Cereal Science, 89, 102708.

Dizlek H, Özer MS, Gül H. 2008. Keklerin yapısal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan ölçütler", Türkiye 10. Gıda Kongresi.

Grenier D, Lucas T, Le Ray D 2019. Enhanced aeration of part-baked bread using a novel combination of baking and partial vacuum. Journal of Food Engineering, 248, 62-70.

Majzoobi M, Poor ZV, Jamalian J, Farahnaky A 2016. Improvement of the quality of gluten-free sponge cake using different levels and particle sizes of carrot pomace powder. International Journal of Food Science Technology, 51(6), 1369-1377.

Özçandır Kıvanç S, 2013. Süne-kımıl (Eurygaster Spp. ve/veya Aelia Spp.) zarari görmüş unların kek, bisküvi ve ekmeklerde akrilamid ve hidroksimetilfurfural (hmf) oluşumuna etkisi. Hacettepe University Food Engineering Master Thesis.

Palazoğlu TK, Coşkun Y, Tuta S, Mogol BA, Gökmen V 2015. Effect of vacuum-combined baking of cookies on acrylamide content, texture and color. European Food Research and Technology, 240(1), 243-249.

Rondeau-Mouro C, Godfrin C, Cambert M, Rouillac J, Diascorn Y, Lucas T, Grenier D 2019. Characterization of gluten-free bread crumb baked at atmospheric and reduced pressures using TD-NMR. Magnetic Resonance in Chemistry, 57(9), 649-660.

Salehi F, Aghajanzadeh S 2020. Effect of dried fruits and vegetables powder on cakes quality: A review. Trends in Food Science & Technology, 95:162-172.

Turabi E, Sumnu G, Sahin S 2008. Rheological properties and quality of rice cakes formulated with different gums and an emulsifier blend. Food Hydrocolloids, 22, 305-312.

Tuta Şimşek S 2020. Evaluation of partial-vacuum baking for gluten-free bread: Effects on quality attributes and storage properties. Journal of Cereal Science, 91, 102891.

Tuta Şimşek S 2019.Vacuum-combined baking to enhance quality properties of gluten-free cake: Multi-response optimization study. LWT, 116, 108557.

Tsatsaragkou K, Papantoniou M, Mandala I 2015. Rheological, physical, and sensory attributes of gluten-free rice cakes containing resistant starch, Journal of Food Science, 80(2), 341-348.

Van Biesen A, Petit C, Vanzeveren E, Puratos NV 2010. Sensory quality definition of food ingredients. Sensory Analysis for Food and Beverage Quality Control, 186–202.

# *Stigmaeus mitrofanovi* Khaustov Türünün (Trombidiformes: Stigmaeidae) Türkiye'den İlk Kaydı

Sibel DOĞAN*[1], Salih DOĞAN[2]

[1]Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Erzincan, Türkiye
[2]Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye

*Sorumlu Yazar e-mail: sibel.dogan@erzincan.edu.tr

**Özet**

*Stigmaeus* Koch, bilinen 148 türü ile Stigmaeidae familyasının en büyük cinsini oluşturmaktadır. Bu türlerden biri olan *Stigmaeus mitrofanovi* Khaustov, Kırım'dan tanımlanmış, daha sonra Rusya'dan kaydedilmiştir. *S. mitrofanovi*'nin dokuz dişi örneği Pülümür Vadisi'nden (Tunceli) bulunmuştur. Bu tür, toplanan örnekler üzerinden yeniden tanımlanmış ve faz kontrast mikroskobunda çekilen görüntülerine yer verilmiştir. Türün Türkiye'den ilk kaydı bu çalışma ile verilmiştir. Pülümür Vadisi çok farklı habitatları barındırmaktadır. *S. mitrofanovi*'nin buradan bulunması vadinin biyolojik çeşitlilik açısından zengin olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Akar, *Stigmaeus*, Stigmaeidae, Pülümür Vadisi, Türkiye.

## First Record of *Stigmaeus mitrofanovi* Khaustov (Trombidiformes: Stigmaeidae) from Turkey

**Abstract**

*Stigmaeus* Koch is the largest genus in the family Stigmaeidae with 148 valid species. One of them, *Stigmaeus mitrofanovi* Khaustov was given before from Crimea and later recorded from Russia. Nine female specimens of *S. mitrofanovi* were found from Pülümür Valley (Tunceli) in Turkey. This species was re-described on the collected specimens and its phase-contrast micrographs were given here. This is the first record from Turkey. The Valley have very different habitats, and occurrence of *S. mitrofanovi* shows that it is rich in terms of biodiversity.

**Keywords:** Mite, *Stigmaeus*, Stigmaeidae, Pülümür Valley, Turkey.

## GİRİŞ

Stigmaeidae Oudemans, Raphignathoidea üst famiyasına mensup büyük bir familyadır. Bu familyanın üyeleri genelde serbest yaşayan (Fan ve ark., 2016). Stigmaeidlerin 33 cinsi ve 600'den fazla türü vardır. Bu cinslerden biri de *Stigmaeus* Koch'tur. Bu cinsin dünyada bilinen toplam 148 türü vardır (Fan ve ark., 2016; Khaustov ve ark., 2017; Doğan, 2019a; Khaustov, 2019; Doğan ve Doğan, 2020). Şuana kadar bu 148 türden 47'sinin kaydı Türkiye'den verilmiştir (Akyol, 2019; Doğan, 2019a,b; Doğan ve Doğan, 2020).

Bu çalışmada, *Stigmaeus mitrofanovi* Khaustov türünün kaydı Pülümür Vadisi'nden verilmiştir. *S. mitrofanovi*'nin yedi dişi örneği alınan döküntü, toprak ve yosun örnekleri içinde tespit edilmiştir. Daha önce Kırım ve Rusya'dan bilinen bu türün vadiden toplanan örnekleri üzerinden yeniden tanımı yapılmış ve daha önce bilinen örnekleri ile aralarındaki yapısal farklılıklara değinilmiştir. Bu çalışma ile hem farklı bir coğrafyaya sahip Pülümür Vadisi'nin hem de Türkiye'nin akar faunasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma kapsamında Pülümür Vadisi'nden (Tunceli) toplanan akarlar içerisinden *Stigmaeus mitrofanovi*'ye ait örnekler incelenmiştir. Vadiden alınan toprak, döküntü ve yosun örnekleri naylon torbalara konularak etiketlenip laboratuvara getirilmiş ve Berlese hunilerinden oluşan ayıklama düzeneğine yerleştirilmiştir. Akar örneklerinin ayıklanması, ağartılması, preparasyonu, ölçümü ve görüntüleme işlemleri Fan ve Zhang (2005) ile Doğan ve ark. (2016) tarafından belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, burada tekrar değinilmemiştir. Metinde geçen ölçümlerde ilk verilen değer ortalamayı, parantez içerisinde verilen değerler ise değişim aralığını göstermektedir. Çalışmada, Grandjean (1944) ve Kethley (1990) tarafından önerilen terminoloji tercih edilmiştir.

## BULGULAR

### Sistematik

Familya: Stigmaeidae Oudemans

Cins: *Stigmaeus* Koch

Tip Türü: *Stigmaeus cruentus* Koch

### *Stigmaeus mitrofanovi* Khaustov

**DİŞİ** (Şekil 1-3)

Vücut 401 (362-456) µm uzunluğunda, 234 (208-291) µm genişliğindedir.

Gnatozoma (Şekil 3) 83 (81-85), keliser 105 (102-108), palp 97 (95-99) µm uzunluğundadır. Palp beş segmentli ve palp trokanterinden palp tarsusuna doğru kılların sayısı şu şekildedir: 0, 3, 2, 2+1 tırnak+1 yardımcı tırnak, 4+1ω+1 diken şeklinde öpatidiyum+1 bazalda kaynaşmış uçta çatallanmış terminal öpatidiyum. Subkapitulum kıllarının uzunlukları ve aralarındaki mesafeler şöyledir; *m* 13 (12-13), *n* 12 (12-13), *m*–*m* 19 (18-20), *n*–*n* 13 (12-13), *m*–*n* 13 (12-13) µm.

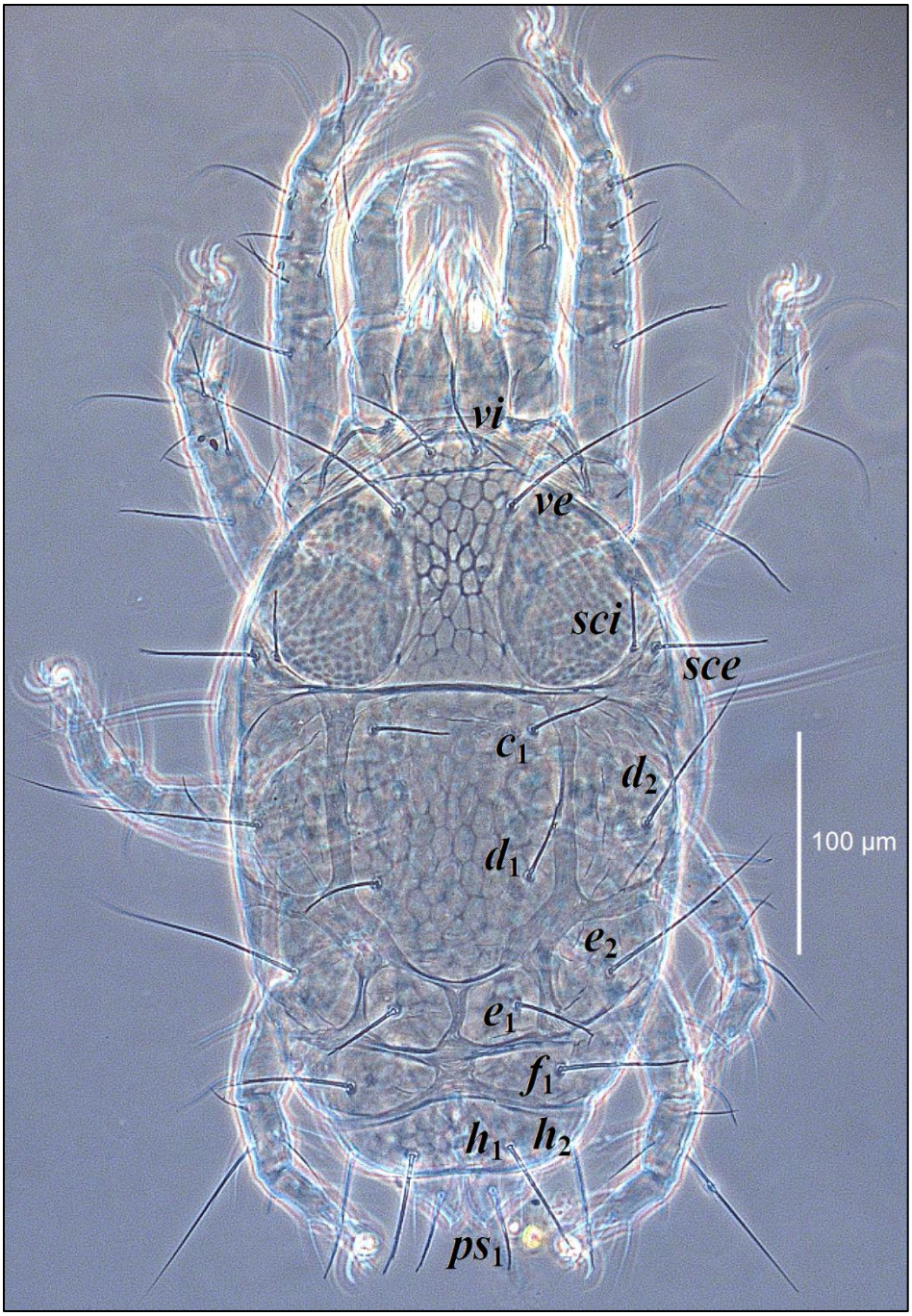
Sırt, plaklar dışında çizgili integüment ile kaplıdır (Şekil 1). Propodozoma plağında üç çift kıl (*vi*, *ve*, *sci*) ve bir çift gözardı cisim vardır. Gözardı cisim 81 (78-85) µm çapındadır ve üzeri desenlidir. *sce* kılları bir çift küçük plak üzerinde yer almaktadır. Merkezi plak iki çift ($c_1$, $d_1$) kıl taşımaktadır. $d_2$ kılları yanal plaklar üzerinde, $e_2$ kılları lateral zonal plaklar üzerinde, $e_1$ kılları median zonal plaklar üzerinde bulunmaktadır. Çift haldeki interkalar plaklar üzerinde $f_1$ kılları yer almaktadır. Suranal plak bütün halde ve iki çift suranal kıl ($h_1$, $h_2$) taşımaktadır. Bütün dorsal plaklar ağsı desene sahiptir. Sırt kıllarından *ve*, $d_2$, $e_2$ sivri uçlu ve çentiksizdir. Diğer kıllar ise uca doğru hafif çentikli yapıdadır. Sırt kıllarının uzunlukları ve aralarındaki mesafeler şöyledir; *vi* 45 (44-46), *ve* 102 (95-110), *sci* 26 (25-27), *sce* 47 (45-49), $c_1$ 33 (32-33), $c_2$ 90 (85-96), $d_1$ 35 (34-35), $d_2$ 66 (62-75), $e_1$ 36 (35-37), $e_2$ 84 (78-93), $f_1$ 56 (55-56), $h_1$ 50 (48-52), $h_2$ 50 (48-53), *vi*–*vi* 20 (18-21), *ve*–*ve* 48 (47-49), *vi*–*ve* 34 (27-38), *sci*–*sci* 153 (151-155), *ve*–*sci* 80 (78-81), *sce*–*sce* 177 (175-181), *sci*–*sce* 8 (7-9), $c_1$–$c_1$ 70 (67-75), $d_2$–$d_2$ 185 (169-217), $c_1$–$d_1$ 63 (61-66), $c_1$–$d_2$ 71 (61-84), $d_1$–$d_1$ 65 (60-68), $d_2$–$d_1$ 65 (53-75), $e_2$–$e_2$ 163 (135-194), $d_2$–$e_2$ 82 (63-99), $d_1$–$e_1$ 65 (53-75), $d_1$–$e_2$ 70 (51-90), $e_1$–$e_1$ 53 (52-54), $e_2$–$e_1$ 55 (42-62), $f_1$–$f_1$ 92 (89-96), $e_1$–$f_1$ 49 (32-61), $e_2$–$f_1$ 63 (47-77), $f_1$–$h_1$ 49 (37-62), $f_1$–$h_2$ 45 (28-56), $h_1$–$h_1$ 43 (40-45), $h_2$–$h_2$ 94 (91-96), $h_1$–$h_2$ 23 (21-25) µm.

Vücudun alt yan tarafında humeral plaklar yer almakta ve $c_2$ kıllarını taşımaktadır. $c_2$ kılları sivri uçlu yapıdadır. Koksisternal plaklar bölünmüş ve üzerinde 1*a*, 3*a* ve 4*a* kıllarını taşımaktadır (Şekil 2). Bu kılların uzunlukları ve aralarındaki mesafeler şöyledir; 1*a* 13 (13-14), 3*a* 13 (12-14), 4*a* 14 (14-15), 1*a*–1*a* 22 (20-23), 3*a*–3*a* 29 (28-30), 4*a*–4*a* 21 (20-22) µm. Aggenital plak üzerinde üç çift kıl vardır. Bir çift genital ve üç çift pseudanal kıl bulunur. Bu kılların uzunlukları şöyledir; $ag_1$ 13 (13-14), $ag_2$ 15 (14-16), $ag_3$ 17 (16-17), $ps_1$ 34 (33-35), $ps_2$ 18 (18-19), $ps_3$ 17 (16-17) µm.

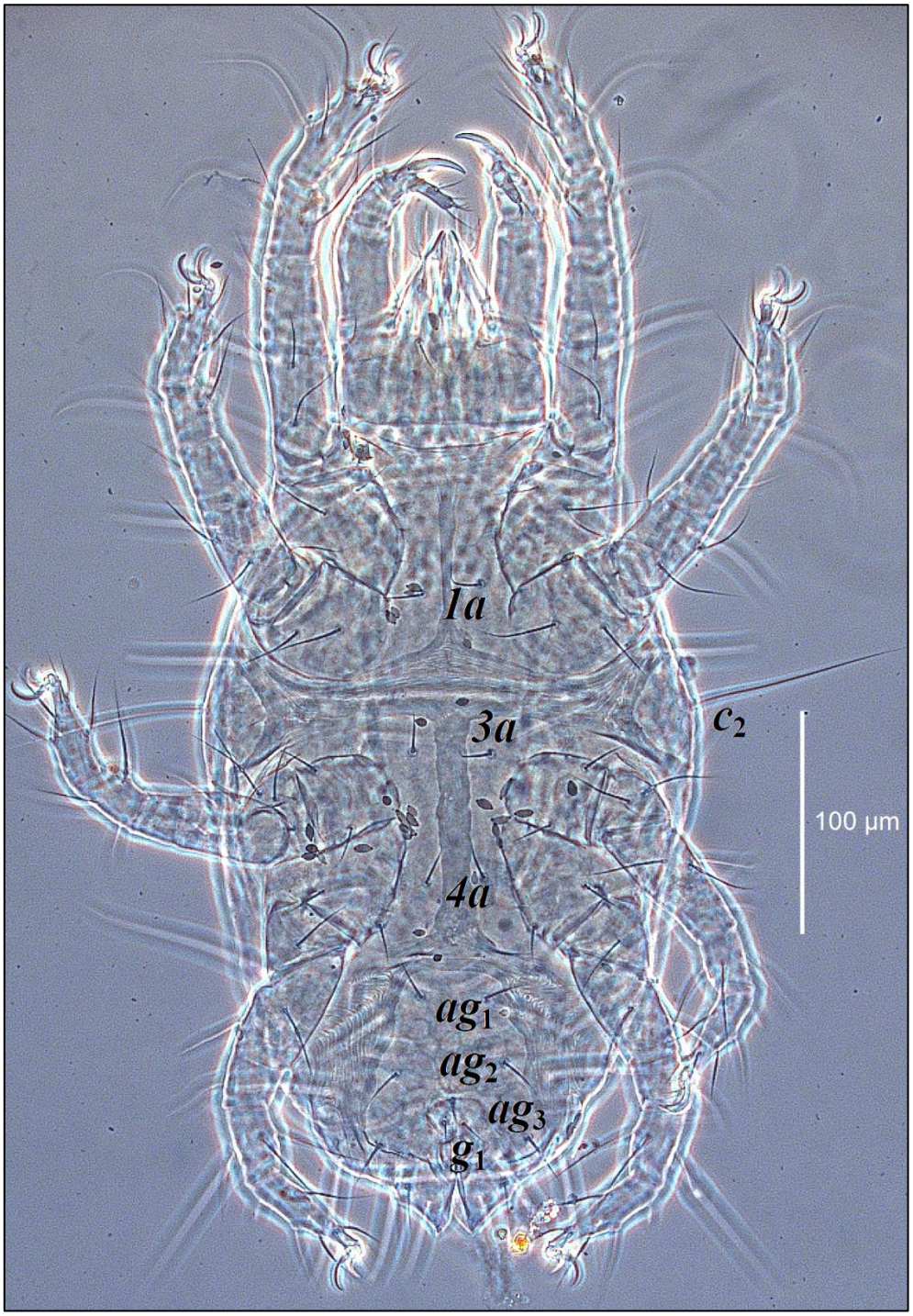
Bacak uzunlukları sırasıyla; I.B 208 (204-212), II.B 171 (168-173), III.B 165 (163-167), IV.B 192 (190-194) µm'dir. Bacak parçaları üzerindeki kılların dağılımı ise şöyledir; koksa: 2–2–2–2, trokanter: 1–1–2–1, femur: 6–5–3–2, genu: 3(+1κ)–3(+1κ)–1–1, tibiya: 5(+1φ+1φρ)–5(+1φρ)–5(+1φρ)–5(+1φρ), tarsus: 13(+1ω)–9(+1ω)–7(+1ω)–7(+1ω).

**İncelenen Örnekler:** 2♀♀, Pülümür, Kımızı Köprü, Kaymaztepe Köyü, çürümüş söğüt kovuğundan döküntü ve toprak, 39°23'38,3"K 39°48'03,1"D, 1400 m, 24.11.2018; 1♀, Pülümür, Çobanyıldızı Köyü yolu, çürümüş meşe gövdesi ve üzeri yosun, 39°27'17,3"K 39°54'27,6"D, 1579 m, 27.04.2019; 4♀♀, Pülümür, Kırmızıköprü, Harçik-2 Köprüsü yakını, üzeri yosunlu ceviz gövdesi ile ceviz ağacının kovuğundan toprak, 39°21'48,1"K 39°47'17,0"D, 1175 m, 27.04.2019.

**Yayılışı:** Kırım ve Rusya (Khaustov, 2014; Khaustov ve Abramov, 2017; Fan ve ark., 2016, 2019).




Şekil 1. *Stigmaeus mitrofanovi* (Dişi). Üstten görünüm.




Şekil 2. *Stigmaeus mitrofanovi* (Dişi). Alttan görünüm.




Şekil 3. *Stigmaeus mitrofanovi* (Dişi). Gnatozoma.

## TARTIŞMA

Ülkemiz faunası için yeni olan bu tür, ilk olarak bir örnek üzerinden Kırım'dan tanımlanmış (Khaustov, 2014), daha sonra Rusya'dan kaydı verilmiştir (Khaustov ve Abramov, 2017). Pülümür örnekleri genel olarak tip örneğiyle benzer morfolojiye sahiptir. Farklı olarak, vücut bir örnek hariç daha küçük (Kırım örneğinde vücut 605 µm uzunluğunda ve 405 µm genişliğinde), *sce* kılları daha kısa ve ucu çentikli yapıdadır (Şekil 1) (Kırım örneğinde *sce* kılları uzun ve sivri uçludur).

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 118Z469 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden ötürü ilgili kuruma teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Akyol M 2019. A new species of the genus *Stigmaeus* Koch (Acari: Stigmaeidae) from the Aegean region of Turkey. Systematic and Applied Acarology, 24 (4): 581-586.

Doğan S 2019a. A new species of the genus *Stigmaeus* Koch (Acari: Stigmaeidae) from Turkey. International Journal of Acarology, 45 (3): 141-147.

Doğan S 2019b. Raphignathoidea (Acari: Trombidiformes) of Turkey: A review of progress on the systematics, with an updated checklist. Acarological Studies, 45 (3): 141-147.

Doğan S, Dilkaraoğlu S, Erman O, Faraji F, Bingül M, Zeytun E, Ersin F 2016. *Stigmaeus solidus* Kuznetsov'un (Acari, Raphignathoidea, Stigmaeidae) Türkiye ve Hollanda örnekleri üzerinden yeniden tanımı. Türkiye Entomoloji Bülteni, 6: 33-42.

Doğan S, Doğan S 2020. Pülümür Vadisi'nden (Türkiye) yeni bir *Stigmaeus* Koch (Acari, Stigmaeidae) Türü. Acarological Studies, 2 (1): 41-45.

Fan QH, Flechtmann CHW, De Moraes DJ 2016. Annotated catalogue of Stigmaeidae (Acari: Prostigmata), with a pictorial key to genera. Zootaxa, 4176: 1-199.

Fan QH, Flechtmann CHW, De Moraes DJ 2019. Emendations and updates to "Annotated catalogue of Stigmaeidae (Acari: Prostigmata), with a pictorial key to genera". Zootaxa, 4647(1): 88-103.

Fan QH, Zhang ZQ 2005. Raphignathoidea (Acari: Prostigmata, Fauna of New Zealand, 52: 1-400.

Grandjean F 1944. Observations sur les acariens de la famille des Stigmaeidae. Archives des Sciences physiques et naturelles, 26: 103-131.

Kethley J 1990. Acarina: Prostigmata (Actinedida), in Soil Biology Guide, pp. 667-756, Ed. Dindal, D.L., John Wiley and Sons.

Khaustov AA 2014. New species and new records of mites of the genus *Stigmaeus* (Acari: Prostigmata: Stigmaeidae) from Crimea. Zootaxa, 3794(2): 237-253.

Khaustov AA 2019. Contribution to systematics of the genus *Eustigmaeus* (Acari: Stigmaeidae) of Russia. Acarologia, 59(1): 152-173.

Khaustov AA, Abramov VV 2017. A new species and a new record of raphignathoid mites (Acari: Raphignathoidea: Camerobiidae, Stigmaeidae) occurring in the galleries of bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) from Russia. Systematic and Applied Acarology, 22(9): 1385-1398.

Khaustov AA, Ueckermann EA, Theron PD 2017. A new species of *Stigmaeus* (Acari: Prostigmata: Stigmaeidae) from South Africa. Systematic and Applied Acarology, 22: 1413-1421.

# The protective effect of erythropoietin on apoptotic cell death induced by amyloid β in PC12 cells.

Servet Kızıldağ[1*], Şermin Genç[2], Serap Kurt[3], Sefa Kızıldağ[3], Meral Sakızlı[3], Meral Fadıloğlu[4]

[1*] Dokuz Eylül University, Vocational School of Health Sciences, İzmir, Turkey
[2] Dokuz Eylül University, Graduate Schools of Health Sciences, İzmir, Turkey
[3] Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, İzmir, Turkey
[4] Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Biochemistry, İzmir, Turkey

*Corresponding author: servet.kizildag@deu.edu.tr

**Abstract**

**Aim of the study :** Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by central nervous system degeneration and neuronal loss. The neuropathological hallmark of AD includes widespread neuronal loss, extracellular amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles. Evidence suggests that this neuronal loss occurs through apoptosis. Therefore, determining the agents that may prevent neuronal death in experimental cell culture models in vitro might contribute to establish effective treatment strategies for AD. It has been shown that in various models erythropoietin (epo) has a neuroprotective effect. Evaluation of the impact of epo administration on caspase cascade, neuronal apoptosis and the cell viability in the neuronal death model induced by amyloid β(Aβ) peptide is aimed and planned.

**Material and methods :** In this study, apoptotic neuronal death was induced in PC12 cells by the administration of $A\beta_{(25-35)}$ peptide fragment. In evaluating levels of neuronal injury and the potential protective effect of epo, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction cell viability assay and trypan blue exclusion were performed. Apostain immunofluorescein staining has been used for the evaluation of apoptotic cell death. Caspase-8 activation was evaluated by western blotting method.

**Results :** Epo administration was shown to protective effect on cell viability in $A\beta_{(25-35)}$ induced neuronal cell death. Apostain immunofluorescein staining revealed that epo had an anti-apoptotic effect in this experimental model. A reduction in caspase-8 activation was observed after epo administration.

**Conclusion:** Epo was demonstrated to have a cell protective effect in neurotoxicity induced by $A\beta_{(25-35)}$ peptide and to diminish the apoptosis by decreasing activation of caspase-8 which promotes apoptosis. This results suggest that epo may have a role in management of Aβ peptide neurotoxicity in AD.

**Keywords:** Erythropoietin, Amyloid β, Apoptosis, Neuroprotection, Alzheimer's disease.

## INTRODUCTION

AD is the most common form of dementia in the elderly. AD is a neurodegenerative disease characterized by degeneration of the central nervous system and loss of neurons. In the neuropathology of the disorder, there is widespread neuronal destruction in which abnormal accumulation of extracellular amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles are observed.(Hardy, 1997) The main constituent of the plaques is Aβ, a 40-42/43 amino acids long peptide, deriving from processing with amyloidogenic pathway the amyloid precursor protein (APP) via the sequential cleavage by β- and γ-secretases. The secreted Aβ peptides are released outside of the cell in exosomes, forming oligomers, protofibrils, fibrils, and finally accumulating as senile plaques. (Yuksel & Tacal, 2019) 'amyloid cascade hypothesis' argues that Aβ deposition is the initiator for AD pathogenesis. Accumulated Aβ induces neuronal cell death directly or indirectly by creating multiple cytotoxic effects on neuronal cells, including oxidative stress and replacement of ionic homeostasis (Niikura et al., 2006). It is known that neuronal degeneration and death in AD are partly due to activation of apoptosis-related pathways or apoptosis itself. (Christie et al., 2007)(Ivins et al., 1999)

Neuronal apoptosis is one of the pathological features of AD. Aβ has been shown to be neurotoxic in vitro and in vivo with morphological pathology. In vivo toxic properties of Aβ-related fragments are well known in cultured rats and human neurons. This model allowed us to examine the molecular functions of endogenous regulatory pathways in AD. (Li et al., 2016)

Aβ-induced cell death exhibits typical features of apoptosis: neurite beading, membrane blebbing, chromatin condensation, and DNA fragmentation and is initiated by a family of aspartate proteases, known as caspases that are activated from pro-caspases to their active form by proteolysis. Presently, there are two major pathways of apoptosis: the death-receptor pathway in which caspase-8 plays a pivotal initiator role and the mitochondrial pathway involving oxidative stress and activation of caspase-9. The most characterized initiator caspase is caspase-8 which has been implicated in Fas/CD95 or tumor necrosis factor (TNF) receptor cell death program. In this regard, caspase-8 is thought to be the most apical member of the family of caspases that is recruited by adapter proteins (e.g., Fas associated death domain, FADD) and converted to an active form by autoproteolysis. Cleavage of caspase-8 results in two active fragments of 11 and 18 kDa, both of which represent the activated form of the enzyme.(Christie et al., 2007) (Nagata, 2018)

Epo is a hematopoietic growth factor produced in kidney and fetal liver which stimulates proliferation and differentiation of erythroid precursor cells. It is also produced in the central nervous system (CNS) and exerts nonhematopoietic effects. (Dame et al., 2001) (Bunn, 2013)

Its protective effect has been demonstrated in in vitro damage models such as the presence of excitotoxic stimuli in neurons and other nervous system cells, the absence of serum and neurotrophic factors (Habib et al., 2019), the presence of kainic acid (Y.J. et al., 2007), N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated glutamate toxicity (Xu et al., 2009). Protective and healing effects have been observed in experimental in vivo global and focal ischemia, trauma (Sirén et al., 2001), immune-mediated inflammation (Mausberg et al., 2011), subarachnoid hemorrhage (Wei et al., 2017) and Parkinsonism models (Kanaan et al., 2006).

In the present study, using the rat pheochromocytoma cell line (PC12) that has been successfully used as a model for neuronal functional studies we investigated the effect of epo on neuronal apoptosis induced by Aβ. We performed experiments aimed at exploring whether epo could protect neurons from Aβ-induced apoptosis.

Testing the agents that can protect neurons from apoptotic death in cell culture experimental models may contribute to finding effective treatment methods that can be applied for AD. The neuroprotective effect of epo has been demonstrated in different models of damage. In the neuronal death model induced by the Aβ, it was aimed and evaluated to the effect of epo on activation of caspase cascade in neuronal apoptosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Materials was purchased from ; Epo from the Roche (NeoRecormon), PC12 cell line from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Amyloid $\beta_{(25–35)}$ (Cat. No: A-4559) from the (Sigma-Aldrich, USA), Western Blot Chemiluminescence Reagent (Cat. No: RPN2109) from the (Ammersham, USA), Fetal calf serum and horse serum from the (Sigma-Aldrich, USA), Mouse anti-single-stranded DNA monoclonal antibody (Cat no:MAB3299) from the (Chemicon Int, USA), DAPI-Antifade (4,6-diamidino-2 fenilindol) (Cat No: 32-804830) from the Vysis, Abbott, USA), Rabbit polyclonal caspase-8 antibody (Cat. No: SC-7 890) from the (Santa Cruz, USA), caspase -8 specific inhibitor (Z-IETD-FMK) (Cat. No: C1230) from the (Sigma-Aldrich, USA), Pierce BCA Protein assay from the (Thermo Fisher Scientific, USA), FITC conjugated goat anti mouse antibody (Cat. No: 02-18-03) from the (KPL, SeraCare, USA) , Goat Anti Rabbit IgG HRP conjugated antibody (Cat. No: 074-1506) from the (KPL, SeraCare, USA).

### Methods

### Cell culture and treatment

PC12 cells were grown in RPMI 1640 medium containing 5% fetal calf serum and 10% heat-inactivated horse serum at 37°C in a 5% $CO_2$ atmosphere. Undifferentiated PC12 cells were seeded at a density of 3 x $10^6$, 5 x $10^5$ and 2 x $10^4$ in a 25 $cm^2$ flask, 6-well, 96-well plate respectively, previously coated with 50 mg / ml poly-D lysine. Cells were then allowed to adherence and confluence before experimentation. All experimental conditions were established in sets of triplicates.

The first experimental set was designed to determine the optimal $A\beta_{(25-35)}$ concentration. Without $A\beta_{(25-35)}$ fragments condition was considered as a control condition. $A\beta_{(25-35)}$ fragment was added to the other wells with a final concentration of 20µM, 40µM, 60µM, 80µM, respectively, and incubated for 24 hours. The second set of experiments was designed to determine the optimal exposure time; 20µM $A\beta_{(25-35)}$ was added all wells and exposure to 24, 48 and 72 hours respectively. Finally, the cells were incubated with 20 µM $A\beta_{(25-35)}$ and 0.1,0.5,1.0 and 2.0 U/mL epo for 24 h . For caspase-8 inhibition condition, cells were pre-treated with caspase-8 specific inhibitor benzyoxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-fluoromethyl ketone (z-IETD-fmk) 2 h prior to exposure to with epo.

**Analysis of cell viability**

PC12 cells were plated at a density of 2 x $10^4$ cells/300 µl medium in 96-well plates, and the cell viability was determined by the conventional MTT reduction assay. The MTT assay relies primarily on mitochondrial metabolic capacity of viable cells and reflects the intracellular redox state. After incubation, cells were treated with the MTT solution (final concentration, 0.4 mg/ml) for 3 h. The dark blue formazan crystals formed in intact cells were solubilized with 200µl dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to all wells and kept at 37 C for 30 minutes, then 50 µl glycine buffer added to all wells end absorbance at 595 nm was measured with a microplate reader (Novapath, BioRad). Results were expressed as the percentage of MTT reduction, assuming that the absorbance of control cells was 100%. The trypan blue exclusion assay was based on the capability of viable cells to exclude the dye. PC12 cells were plated at the same density as for the MTT assay described above. An equal volume of 0.4% trypan blue staining solution was added to 96-well plated cells, and after 5 min cells were loaded into a hemocytometer and counted for the dye uptake. Counts were performed in triplicate.

**Quantitation of apoptotic cells**

To quantify apoptosis, cells were trypsinized and removed from the cell cultures, centrifuged at 1200 x g for 10 min. Cells were then fixed with methanol then incubated primarily with the MAB3299 antibody and secondary with the FITC-conjugated goat-anti-mouse secondary antibody and finally DAPI-antifade was added. DAPI-stained cells were visualized by fluorescence microscopy. At least 200 cells were counted in each condition. Cells with condensed chromatin and fragmented nuclear DNA were considered apoptotic. The percentage of apoptotic cells in each culture was determined.

**Western Blot Analysis for caspase-8**

Following treatment, cells (3x $10^6$ cells /25$cm^2$ flask) were collected and washed with phosphate buffered saline (PBS). After centrifugation, cell lysis was carried out at 4°C by vigorous shaking for 15 min in lysis buffer. After centrifugation at 13,000 rpm, +4°C for 15 min, supernatant was separated and stored at -80°C until use. The protein concentration was determined by using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit. After the addition of sample loading buffer, protein samples were electrophoresed on a 12% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred to poli vinil diflorür (PVDF) membrane blots at 300 mA for 2h at room temperature. The blots were blocked for 1 h at room temperature in fresh blocking buffer (0.1% Tween-20 in tris-buffered saline, pH 7.4, containing 5% nonfat dried milk). Dilutions (1:1000) of primary anticaspase-8 antibody or anti-ß-actin were made in PBS with 3% nonfat dry milk. Following three washes with PBST (PBS and 0.1% Tween-20), the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies in PBS with 3% nonfat dry milk for 1 h at room temperature. The blots were washed again three times in PBST buffer, and transferred proteins were incubated with enhanced chemiluminescence (ECL) substrate solution for 1 min, according to the manufacturer's instructions, and visualized with Kodak X-ray film.

## Statistical Analysis

Data are presented as mean ±S.E. Statistical analysis of the data for multiple comparisons was performed by analysis of variance (ANOVA). For single comparison, the significance of differences between means was determined by t test. A value of $P<0.05$ was considered statistically significant.

## Results

Cell viability was measured by the trypan blue exclusion (as shown in Figure 1 A,B,C) and reduction of MTT activity (as shown in Figure 1 D,E,F). (A;D) $A\beta_{(25-35)}$ caused loss of cell viability in a dose-dependent manner ($P<0.05$) compared with control without $A\beta_{(25-35)}$. (B,E) time course changes in cell viability in PC12 cells with 20µM of $A\beta_{(25-35)}$ ($P<0.05$) compared to 0 hour group . (C, F) preincubation with epo for 24 h protected PC12 cells in a dose-dependent manner from $A\beta_{(25-35)}$ toxicity ($P<0.05$) compared with group without epo pretreatment.

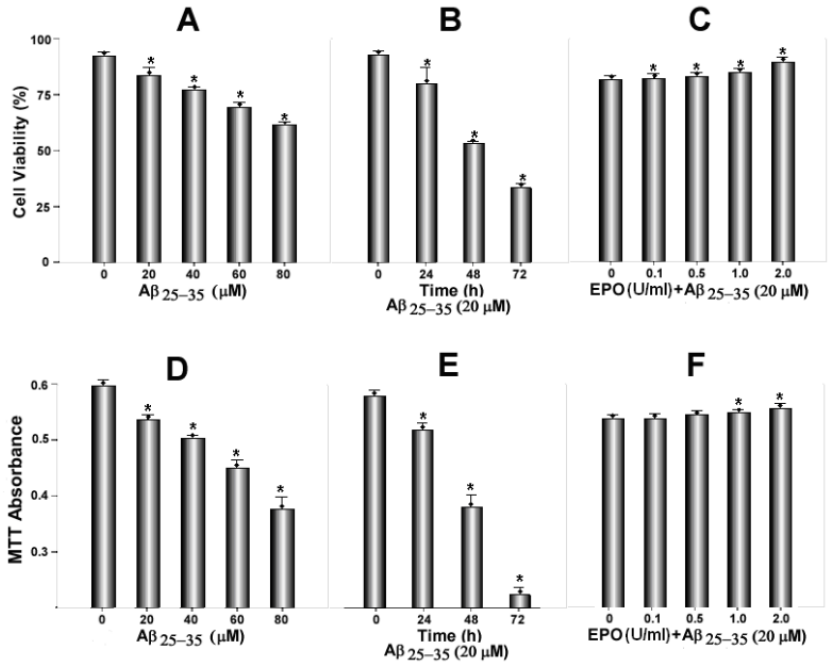



**Figure 1:** $A\beta_{(25-35)}$ caused loss of cell viability in a dose-dependent manner ($P<0.05$) compared with control without $A\beta_{(25-35)}$, cell viability was measured by tryphan blue assay **(A)** and MTT assay **(D)**. Time course changes in cell viability in PC12 cells with 20µM of $A\beta_{(25-35)}$ ($P<0.05$) compared to 0 hour group, cell viability was measured by tryphan blue assay **(B)** and MTT assay **(E)**. Preincubation with epo for 24 h protected PC12 cells in a dose-dependent manner from $A\beta_{(25-35)}$ toxicity ($P<0.05$) compared with group without epo pretreatment, cell viability was measured by tryphan blue assay **(C)** and MTT assay **(F)**

Apostain immunofluorescein staining revealed that epo had an anti-apoptotic effect in this experimental model. Yellow arrows indicate typical apoptotic cell nuclei with chromatin condensation (as shown in Figure 2A). The percentage of cells with apoptotic nuclei was quantified by visualizing nuclear morphology using the ssDNA specific monoclonal antibody by labeling fluorescein. Treatment with epo before exposure to $A\beta_{(25-35)}$ significantly decreased the percentage of apoptotic cells ($P < 0.05$) compared with group treated with $A\beta_{(25-35)}$ only. (as shown in Figure 2B).

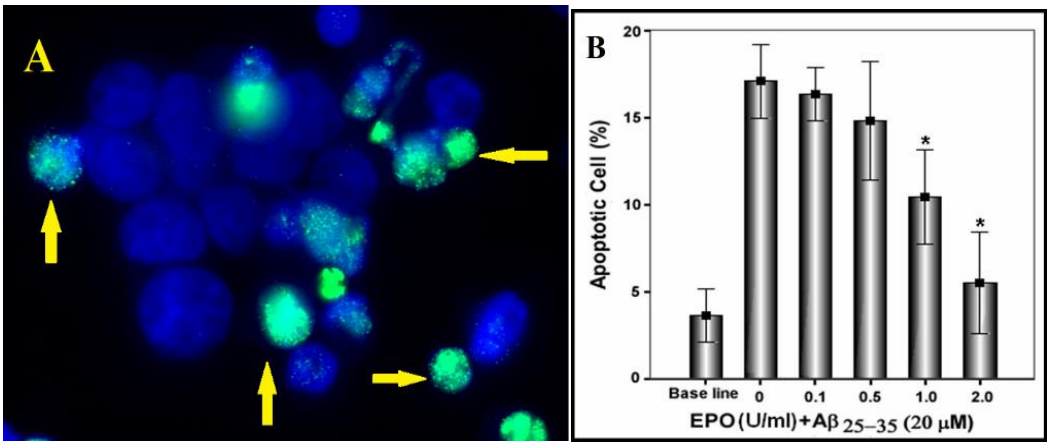



**Figure 2:** The percentage of cells with apoptotic nuclei was quantified by visualizing nuclear morphology using the ssDNA specific monoclonal antibody by labeling fluorescein. Yellow arrows indicate typical apoptotic cell nuclei with chromatin condensation. (A) Treatment with epo before exposure to $A\beta_{(25-35)}$ significantly decreased the percentage of apoptotic cells.*$P < 0.05$ compared with group treated with $A\beta_{(25-35)}$ only. (B)

The cleavage of caspase-8 was assessed by western blot to determine whether this key regulator of apoptosis was involved in $A\beta_{(25-35)}$-induced neurotoxicity. Caspase-8 (55 KDa) was cleaved to generate the smaller 18 KDa active fragment after 24 h of exposure to 20 μM $A\beta_{(25-35)}$). The untreated control sample did not display caspase-8 cleavage. A reduction in caspase-8 activation was observed after epo administration. Pretreatment with EPO as dose dependent manner (1–2 U/ml) showed that partial inhibition of caspase-8 cleavage induced by $A\beta_{(25-35)}$ (as shown in Figure 3).

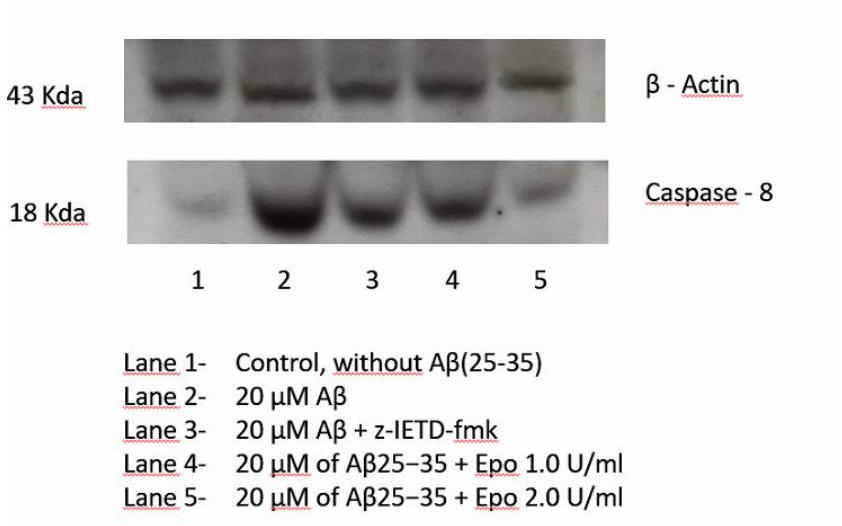



Figure 3: Caspase-8 (55 KDa) was cleaved to generate the smaller 18 KDa active fragment after 24 h of exposure to 20 μM amyloid $\beta_{(25-35)}$. The untreated control sample did not display caspase-8 cleavage. A reduction in caspase-8 activation was observed after epo administration. Pretreatment with EPO as dose dependent manner (1–2 U/ml) showed that partial inhibition of caspase-8 cleavage induced by amilod $\beta_{(25-35)}$

## DISCUSSION

Advanced age is the most important risk factor for all neurodegenerative dementias, and it is important to develop a preventive effective treatment method before the disease occurs.

Increased levels and accumulation of Aβ are the leading factors leading to the onset and progression of cellular function loss in Alzheimer's type dementia (Przedborski et al., 2003).

It has been suggested that accumulating Aβ activates intracellular signaling pathways and initiates programmed cell death by associating with cell surface proteins and then contribute to death of neurons and glia. (Morishima et al., 2001)

It has been reported that Aβ activates the 'extrinsic' pathway through members of the Fas / TNFR cell surface death receptor family and causes caspase-8 activation, which is the initiating protease of this pathway. Caspase-8 activation causes activation of effector caspases, causing apoptosis(Lu et al., 2003). Neuronal apoptosis also occurs in human AD brains(Cotman & Su, 1996).

Several investigators have presented work on the induction of apoptosis by Aβ in multiple cell types in vitro (Cline et al., 2018). We obtained similar results in PC12 cells following exposure to $A\beta_{(25–35)}$. After 24 h exposure to 20 μM of $A\beta_{(25–35)}$, PC12 cells displayed multiple features of apoptosis including cell viability, morphological changes, and caspase-8 activation.

The information provided in the literature shows that epo is a neuroprotective agent by many mechanisms. (Chong et al., 2003) (Wei et al., 2017) (Dzietko et al., 2004) epo is a growth factor with well-described effects on the proliferation, differentiation and survival of erythroid precursor cells. The recent interest in the function of epo outside of hematopoiesis has generated many questions concerning the mechanisms by which epo functions in these non-hematopoietic systems. (Ehrenreich et al., 2004) The function of epo in the nervous system has garnered considerable attention since the discovery that subsets of neurons in both the developing and adult nervous system express the epo receptor. (Juul et al., 1998) A major role for epo in hematopoiesis is to promote the survival of cells belonging to the erythroid precursor pool. The mechanism by which epo prevents programed cell death is still unclear. We have shown here that the after 24 h exposure to 20 μM of $A\beta_{(25–35)}$ than treatment of PC-12 cells with epo causes a decrease apoptosis, suggesting that the neuroprotective effects of epo is necessary and sufficient to protect neurons during Aβ exposure. We showed that epo is neuroprotective against $A\beta_{(25–35)}$ in PC12 cell line cultures. Epo in a concentration range of 0.1 U/ml to 2 U/ml was not toxic to neurons. Yet, protection with epo is achieved in a small concentration range.

As a result, it was shown in this study that epo has a protective effect on cell viability in neurotoxicity caused by $A\beta_{(25–35)}$, reduces neuronal apoptosis, and reduces caspase-8 activation, which plays a role in initiating apoptosis.

The use of agents that are easily tolerated by patients when they are administered peripherally, can cross the blood brain barrier, and have no toxic side effects may be an alternative treatment approach for neurodegenerative diseases. Since epo is a drug that is used very well in millions of patients, it may be possible that this agent will enter clinical practice for neuroprotective purposes.

## CONCLUSION

The use of epo in clinical practice for neuroprotective purposes may cover a wide range of uses from acute conditions such as stroke, chronic neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, AD, Amyotrophic Lateral Sclerosis, demyelinating diseases such as Multiple Sclerosis, and psychiatric diseases such as schizophrenia. We believe that the continuation of such studies will contribute to the treatment of Aβ toxicity observed in AH, which develops due to very different etiological reasons. Further study is needed to confirm these mechanisms and to more thoroughly examine the role that they play in the function of epo outside of hematopoiesis.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported, in part, by the Dokuz Eylul University Scientific Research Branch Office, Research Grant no: 02.KB.SAĞ.037

**REFERENCES**

Bunn, H. Franklin. 2013. "Erythropoietin." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 3 (3). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011619.

Chong, Zhao Zhong, Jing-Qiong Kang, and Kenneth Maiese. 2003. "Erythropoietin Fosters Both Intrinsic and Extrinsic Neuronal Protection through Modulation of Microglia, Akt1, Bad, and Caspase-Mediated Pathways." British Journal of Pharmacology 138 (6): 1107–18. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705161.

Christie, Lori Ann, Joseph H. Su, Christina H. Tu, Malcolm C. Dick, Jun Zhou, and Carl W. Cotman. 2007. "Differential Regulation of Inhibitors of Apoptosis Proteins in Alzheimer's Disease Brains." Neurobiology of Disease 26 (1): 165–73. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.017.

Cline, Erika N., Maíra Assunção Bicca, Kirsten L. Viola, and William L. Klein. 2018. "The Amyloid-β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade." Journal of Alzheimer's Disease. IOS Press. https://doi.org/10.3233/JAD-179941.

Cotman, Carl W., and Joseph H. Su. 1996. "Mechanisms of Neuronal Death in Alzheimer's Disease." Brain Pathology 6 (4): 493–506. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1996.tb00878.x.

Dame, Christof, Sandra E. Juul, and Robert D. Christensen. 2001. "The Biology of Erythropoietin in the Central Nervous System and Its Neurotrophic and Neuroprotective Potential." In Biology of the Neonate, 79:228–35. https://doi.org/10.1159/000047097.

Dzietko, Mark, Ursula Felderhoff-Mueser, Marco Sifringer, Birte Krutz, Petra Bittigau, Friederike Thor, Rolf Heumann, Christoph Bührer, Chrysanthy Ikonomidou, and Henrik H. Hansen. 2004. "Erythropoietin Protects the Developing Brain against N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Neurotoxicity." Neurobiology of Disease 15 (2): 177–87. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.10.006.

Ehrenreich, Hannelore, Carlotta Aust, Henning Krampe, Henriette Jahn, Sonja Jacob, Manfred Herrmann, and Anna Leena Sirén. 2004. "Erythropoietin: Novel Approaches to Neuroprotection in Human Brain Disease." Metabolic Brain Disease 19 (3–4): 195–206. https://doi.org/10.1023/B:MEBR.0000043969.96895.3c.

Habib, Pardes, Ann Sophie Stamm, Thomas Zeyen, Rozina Noristani, Alexander Slowik, Cordian Beyer, Thomas Wilhelm, et al. 2019. "EPO Regulates Neuroprotective Transmembrane BAX Inhibitor-1 Motif-Containing (TMBIM) Family Members GRINA and FAIM2 after Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury." Experimental Neurology 320 (October): 112978. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.112978.

Hardy, John. 1997. "Amyloid, the Presenilins and Alzheimer's Disease." Trends in Neurosciences. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)01030-2.

Ivins, Kathryn J., Phillip L. Thornton, Troy T. Rohn, and Carl W. Cotman. 1999. "Neuronal Apoptosis Induced by β-Amyloid Is Mediated by Caspase-8." Neurobiology of Disease 6 (5): 440–49. https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0268.

Juul, Sandra E., Douglas K. Anderson, Yan Li, and Robert D. Christensen. 1998. "Erythropoietin and Erythropoietin Receptor in the Developing Human Central Nervous System." Pediatric Research 43 (1): 40–49. https://doi.org/10.1203/00006450-199801000-00007.

Kanaan, Nicholas M., Timothy J. Collier, Deanna M. Marchionini, Susan O. McGuire, Matthew F. Fleming, and Caryl E. Sortwell. 2006. "Exogenous Erythropoietin Provides Neuroprotection of Grafted Dopamine Neurons in a Rodent Model of Parkinson's Disease." Brain Research 1068 (1): 221–29. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.10.078.

Li, Xueyuan, Xinjie Bao, and Renzhi Wang. 2016. "Experimental Models of Alzheimer's Disease for Deciphering the Pathogenesis and Therapeutic Screening (Review)." International Journal of Molecular Medicine 37 (2): 271–83. https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2428.

Lu, Daniel C., Gideon M. Shaked, Eliezer Masliah, Dale E. Bredesen, and Edward H. Koo. 2003. "Amyloid β Protein Toxicity Mediated by the Formation of Amyloid-β Protein Precursor Complexes." Annals of Neurology 54 (6): 781–89. https://doi.org/10.1002/ana.10761.

Mausberg, Anne K., Gerd Meyer zu Hörste, Thomas Dehmel, Mark Stettner, Helmar C. Lehmann, Kazim A. Sheikh, and Bernd C. Kieseier. 2011. "Erythropoietin Ameliorates Rat Experimental Autoimmune Neuritis by Inducing Transforming Growth Factor-Beta in Macrophages." PLoS ONE 6 (10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026280.

Morishima, Yoshiyuki, Yukiko Gotoh, Janine Zieg, Tamera Barrett, Hiromichi Takano, Richard Flavell, Roger J. Davis, Yasufumi Shirasaki, and Michael E. Greenberg. 2001. "β-Amyloid Induces Neuronal Apoptosis via a Mechanism That Involves the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway and the Induction of Fas Ligand." Journal of Neuroscience 21 (19): 7551–60. https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-19-07551.2001.

Nagata, Shigekazu. 2018. "Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells." Annual Review of Immunology 36 (1): 489–517. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010.

Niikura, Takako, Hirohisa Tajima, and Yoshiko Kita. 2006. "Neuronal Cell Death in Alzheimers Disease and a Neuroprotective Factor, Humanin." Current Neuropharmacology 4 (2): 139–47. https://doi.org/10.2174/157015906776359577.

Przedborski, Serge, Miquel Vila, and Vernice Jackson-Lewis. 2003. "Neurodegeneration: What Is It and Where Are We?" Journal of Clinical Investigation. https://doi.org/10.1172/JCI200317522.

Sirén, Anna Leena, Maddalena Fratelli, Michael Brines, Christoph Goemans, Simona Casagrande, Piotr Lewczuk, Sonja Keenan, et al. 2001. "Erythropoietin Prevents Neuronal Apoptosis after Cerebral Ischemia and Metabolic Stress." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (7): 4044–49. https://doi.org/10.1073/pnas.051606598.

Wei, Shanwu, Chunxia Luo, Shanping Yu, Jin Gao, Chang Liu, Zheng Wei, Zhiren Zhang, Ling Wei, and Bin Yi. 2017. "Erythropoietin Ameliorates Early Brain Injury after Subarachnoid Haemorrhage by Modulating Microglia Polarization via the EPOR/JAK2-STAT3 Pathway." Experimental Cell Research 361 (2): 342–52. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.002.

Xu, Xiang, Haibin Dai, and Yulan Shi. 2009. "Erythropoietin Protects Primary Cultures of Rat Cortical Neurons from Hypoxia-Induced Toxicity through Attenuating Both Glutamate Release and NMDA Receptor Evoked Neurotoxicity Pathway." Pharmazie 64 (3): 210–13. https://doi.org/10.1691/ph.2009.8715.

Y.J., Won, Yoo J.Y., Lee J.H., Hwang S.J., Kim D., Hong H.N., You Jin Won, et al. 2007. "Erythropoietin Is Neuroprotective on GABAergic Neurons against Kainic Acid-Excitotoxicity in the Rat Spinal Cell Cultures." Brain Research 1154 (1): 31–39. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.010 LK -

Yuksel, Melike, and Ozden Tacal. 2019. "Trafficking and Proteolytic Processing of Amyloid Precursor Protein and Secretases in Alzheimer's Disease Development: An up-to-Date Review." European Journal of Pharmacology. Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172415.

# NMR Relaxometry as a Tool to Understand the Effect of HHP on the Gelation Properties of Fish Gelatin

Purlen Sezer[1*], Ilhami Okur[1,2], Mecit Halil Oztop[1], Hami Alpas[1]

[1]Department of Food Engineering, Middle East Technical University, 06800, Ankara, Turkey
[2]Department of Food Engineering, Niğde Ömer Halisdemir University, 51240, Niğde, Turkey

purlen.sezer@metu.edu.tr

**Abstract**
Gelatin is the most commonly used biopolymer in pharmaceutical, cosmetic, and food applications. The common sources of the gelatin are bovine bone and porcine skin. Rather than porcine gelatin, bovine gelatin has more applications because of religious preferences. In that regard, gelatin could also be obtained from fish, which is very common in nature but has weak gelation ability. High hydrostatic pressure (HHP) treatment affects proteins and results in modifications of them significantly. In this study, the aim was to improve the weak physical properties of fish gelatin and enhanced poor functional properties with the beneficial effects of HHP. Pressure was applied at 400 MPa at two different temperatures as 10 °C and 30 °C by keeping process time constant as 15 minutes. Bovine gelatin was selected as reference material to compare and interpret fish gelatin physical properties. In order to monitor change in physical properties, nuclear magnetic resonance (NMR) relaxometry and gel strength measurements were used. The results showed that HHP treatment change in protein – water interactions. Moreover, NMR Relaxometry was a useful method to detect different attributes of gelatin types on free water.

**Keywords:** HHP, NMR, Fish Gelatin, Gel Strength.

## INTRODUCTION

Gelatin, generally obtained from connective tissues of bovine or porcine, is usually used in the food industry as a gelling agent, thickener, emulsifier, and stabilizer (Cai et al., 2017). Because of religious preferences, safety concerns, and economic considerations, gelatin derived from fish has become more preferable than porcine and bovine gelatin in recent years (Sow & Yang, 2015; Yang & Wang, 2009).

Fish gelatin is accepted as an alternative to common gelatin types but there are some differences between fish and other types of gelatin as porcine and bovine gelatin. It has many drawbacks in the food industry as lower gel strength, lower stability, and lower rheological characteristics than bovine and porcine gelatin (Kaewruang et al., 2014). Lower characteristics of fish gelatin are related to its lower proline and hydroxyproline content than other common types, which is related to the rearrangement of the gelatin network (Haug, Draget, & Smidsrød, 2004).

High Hydrostatic Pressure (HHP), called as a cold pasteurization technique, is an emerging technology and it was generally used in the food industry to increase shelf life of food products by inactivating microorganisms, vegetative cells, and enzymes (Alpas et al., 1999; Alpas et al., 2003). HHP treatment can be done between 100 and 900 MPa to sterilize food material in the vessel (Tian et al., 2014). It may lead to structural modification, aggregation, fragmentation, or gelation of proteins by disrupting hydrophobic and electrostatic bonds. This may cause to improve gelatin network characteristics by affecting interactions between protein and water molecules (Ma et al., 2013; Meng et al., 2017).

HHP can affect protein molecules, especially on hydrophobic and electrostatic bonds. Hence, the study aimed to raise the lower characteristics of fish gelatin by HHP treatment. Another objective of the study is to compare the properties of the fish gelatin with bovine gelatin, which is the most common type.

## MATERIALS AND METHODS

### Raw Materials

Fish gelatin (~240 bloom) was supplied from SG chemicals PTE LTD and bovine gelatin (~240 bloom) from Kervan Gıda Sanayi (Istanbul, Turkey). In the study, bovine gelatin was chosen as reference material.

**Gel Preparation**

Both fish and bovine gelatin solutions were prepared by the same procedure. Gelatin powder and distilled water were mixed in the same concentration (6.67 % w/v) at 30 oC (Norziah et al., 2009). Bloom testing standards were determinant in the gel preparation procedure (REF). Samples were named as F-ctrl, B-ctrl for fish, and bovine gelatin, respectively.

**High Hydrostatic Pressure (HHP) Treatment**

HHP treatments were performed with 760.0118 type pressure equipment supplied by SITEC-Sieber Engineering, Zurich, Switzerland. Pressure increasing and decreasing rate of equipment while pressurization was nearly 5-10s, which was not taken into consideration as in the pressurization time and not added into pressurization time. Completely dissolved solutions were poured into 25 ml sterile polyethylene cryotubes and pressurized (400 MPa) for a constant time (15 min) at two different temperatures as 30 $^{o}$C and 10 $^{o}$C, samples were named as F-P-400-30, B-P-400-30, and F-P-400-10, B-P-400-10 respectively. All pressurized samples were cooled in a refrigerator for 16-18h for maturation before analysis.

**Gel Strength**

The gel strength of the samples determined after 16-18 h maturation time at a fixed volume of 25 mL by using Brookfield Texture Analyzer CT310K, USA. The cylindrical probe with 12.7 mm diameter and 34 mm length was used with a 4 mm penetration depth and a speed of 0.5 mm/s into the samples (Sow & Yang, 2015). The gel strength of the samples was determined from the maximum force required, which was recorded as a unit of g, at the penetration depth of 4 mm.

**Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy Measurements**

Nuclear magnetic resonance measurements (T2) relaxation time were measured with a 0.32 T NMR system operating at the Larmor frequency of 13 MHz (Spin Track SB4, Mary El, Russia). For $T_2$ measurements, fish gelatin samples were placed into the instrument having Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence. $T_2$ CPMG data were measured with 1500 ms echo time, 4000 echos, 600 ms period with 24 scan number. All measurements were done after 16-18 h maturation time.

**Statistical Analysis**

Sigma Plot software package (SigmaPlot Ver.12, Chicago, IL, USA) was used to analyze the results. Using p-values less than 0.05 was accepted as statistically significant. Two-way ANOVA was used to determine which parameters like pressure and temperature in physicochemical properties of fish and bovine gelatin. Tukey's multiple range test was implemented to evaluate significant differences among the experimental mean values ($\alpha \leq 0.05$).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Gel Strength**

The gel strength results of different HHP parameters were shown in fig.1. As seen in figure 1, the highest gel strength result was found at 400 MPa -10 $^{o}$C - 15 min. for fish gelatin (634.025 g) and 400 MPa – 30 $^{o}$C - 15 min. for bovine gelatin (1083.3 g). According to results, pressure and temperature were found to be statistically significant ($p \leq 0.05$).

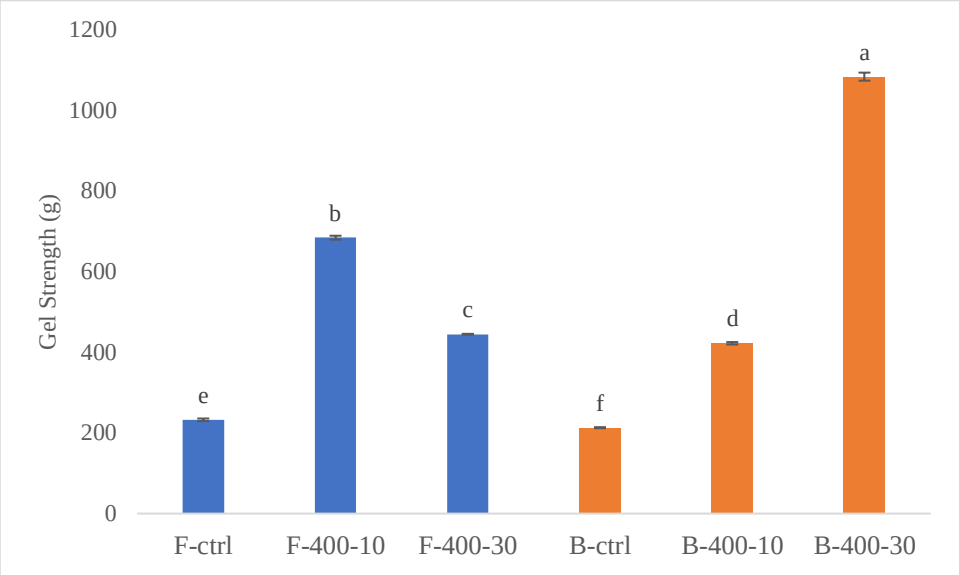



**Figure 1.** Gel strength result of HHP treated fish and bovine gelatin

One of the most important quality parameter of gelatin is gel strength (Karim & Bhat, 2009). Gel strength has influenced the rearrangement of amino acids, molecular weight distribution, random coiling of chains, and intermolecular forces between protein and water molecules (Arnesen & Gildberg, 2002; Muyonga, Cole, & Duodu, 2004). The reason for that fish gelatin has lower characteristics is its lower proline and hydroxyproline content because they are directly contributed to bonding of water molecules and building a gelatin network (Ali, Kishimura, & Benjakul, 2018). Figure 1 shows that HHP treatment results in higher gel strength of both fish and bovine gelatin. The first principle of the HHP treatment is Le Chatelier's principle states that a decrease in volume can lead to change in molecule configurations after pressurization (Walkenström & Hermansson, 1997). Since HHP treatment enhances cross-linking by decreasing free volume and changing molecule configurations, both fish and bovine gelatin have higher gel strength after pressurization (Moreno et al., 2016).

**Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Relaxometry**

Nuclear magnetic resonance (NMR) relaxometry, a rapid and non-destructive method, is usually used to determine the physiological and biochemical change of foods (Kirtil & Oztop, 2016). NMR analysis was based on taking signals to measure longitudinal ($T_1$) and transverse relaxations times ($T_2$). $T_1$ gives information about the time that spin realign along the longitudinal z-axis. On the other hand, $T_2$ is the time constant that characterizes the rate at which Mxy component decays. In this study, NMR measurement was conducted with $T_2$ because hydroxyl groups and amino group protons in protein gels change $T_2$ relaxation time directly (Oztop et al., 2010). The effect of HHP on T2 results of fish and bovine gelatin was shown in Table 1. The result showed that the $T_2$ value of bovine gelatin was lower than the $T_2$ value of fish gelatin. Also, the highest $T_2$ value for fish and bovine gelatin was found at 400 MPa-10 $^{o}$C-15 min. There was no significant difference between control and pressurized fish gelatin ($p>0.05$), while pressure had a significant effect on the $T_2$ value of the bovine gelatin ($p\leq0.05$).

**Table 1.** $T_2$ results of HHP treated fish and bovine gelatin

| Parameter | $T_2$ (ms) |
|---|---|
| F-ctrl | 811.7 ± 16.2 |
| F-P-400-10 | 808 ± 0.6 |
| F-P-400-30 | 800.85 ± 6.55 |
| B-Ctrl | 713.9 ± 2.5 |
| B-P-400-10 | 764.83 ± 2.87 |
| B-P-400-30 | 720.39 ± 0.01 |

Renou et al. (2003) showed that the $T_2$ values of the samples were related to free or expelled water of the samples. Thanks to this, the lower $T_2$ values of bovine gelatin than fish gelatin may be because of different amino acid composition, length of amino acid chains, and their association with water. It was found that the composition of glycine, glutamic acid, imino acids (hydroxyproline and proline), alanine, and arginine in bovine gelatin was higher than fish gelatin (Cheow et al., 2006; Pranoto et al., 2016). Also, it was reported that the imino acid and glycine content affects the stability and interaction between water and protein molecules of the gelatin (Binsi et al., 2009). Imino acids as hydroxyproline have the gel-forming ability by forming hydrogen bonding from their hydroxyl group. These different protein structures of the fish and bovine gelatin result in different attributes on hydrogen bonding, free water, and also on $T_2$ relaxation times.

HHP treated bovine gelatin had longer $T_2$ values than control. Increasing $T_2$ values after HHP treatment might be because of the ability of pressure to change the conformation of the protein structures, especially on the secondary structure (Moreno et al., 2015). Also, Sezer et al. (2020) indicated that the secondary structure of gelatin was changed after HHP treatment. The increasing of the $T_2$ values were showed a redistribution of the water-protein interactions, and it concluded an increase in free water after pressurization. As a result, NMR measurements of gelatin samples showed that $T_2$ values are good indicators to investigate the change in protein structures and intramolecular forces between protein and water molecules.

## CONCLUSION

The study aimed to increase the physical properties of fish gelatin by HHP. According to gel strength results, HHP treatment increased gelatin network stability and gelling ability of molecules. Besides, the different amino acid content of fish and bovine gelatin, effects of HHP on amino acid rearrangement during gelation showed different attributes of free water - protein interaction and also on $T_2$ relaxation times. Therefore, NMR Relaxometry was a useful method to identify protein-water interactions and change in protein structures after HHP treatment. To conclude, HHP results in increasing stability and improving the physical properties of fish gelatin.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Middle East Technical University Research Fund Project [grant number BAP-314-2018-2741].

**REFERENCES**

Ali, A. M. M., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2018). Physicochemical and molecular properties of gelatin from skin of golden carp (Probarbus Jullieni) as influenced by acid pretreatment and prior-ultrasonication. *Food Hydrocolloids*, *82*, 164–172. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.052

Alpas, H, Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P., & Ray, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(9), 4248–4251.

Alpas, Hami, Lee, J., Bozoglu, F., & Kaletunç, G. (2003). Evaluation of high hydrostatic pressure sensitivity of Staphylococcus aureus and Escherichia coli O157:H7 by differential scanning calorimetry. *International Journal of Food Microbiology*, *87*(3), 229–237. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00066-7

Arnesen, J. A., & Gildberg, A. (2002). Preparation and characterisation of gelatine from the skin of harp seal (Phoca groendlandica). *Bioresource Technology*, *82*(2), 191–194. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00164-X

Binsi, P. K., Shamasundar, B. A., Dileep, A. O., Badii, F., & Howell, N. K. (2009). Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (Priacanthus hamrur) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, *23*(1), 132–145. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.004

Cheow, C. S., Norizah, M. S., Kyaw, Z. Y., & Howell, N. K. (2006). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (Johnius dussumieri) and shortfin scad (Decapterus macrosoma). *Food Chemistry*, *101*(1), 386–391. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.046

Haug, I. J., Draget, K. I., & Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, *18*(2), 203–213. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00065-1

Kaewruang, P., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B., & Nalinanon, S. (2014). LWT - Food Science and Technology Impact of divalent salts and bovine gelatin on gel properties of phosphorylated gelatin from the skin of unicorn leatherjacket. *LWT - Food Science and Technology*, *55*(2), 477–482. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.033

Ma, F., Chen, C., Zheng, L., Zhou, C., Cai, K., & Han, Z. (2013). Effect of high pressure processing on the gel properties of salt-soluble meat protein containing CaCl2and κ-carrageenan. *Meat Science*, *95*(1), 22–26. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.025

Meng, X., Bai, Y., Gao, J., Li, X., & Chen, H. (2017). Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine β-lactoglobulin. *Food Chemistry*, *219*, 290–296. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.153

Moreno, H. M., Bargiela, V., Tovar, C. A., Cando, D., Borderias, A. J., & Herranz, B. (2015). High pressure applied to frozen flying fish (Parexocoetus brachyterus) surimi: Effect on physicochemical and rheological properties of gels. *Food Hydrocolloids*, *48*, 127–134. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.029

Moreno, Helena M., Herranz, B., Borderías, A. J., & Tovar, C. A. (2016). Effect of high pressure treatment on the structural, mechanical and rheological properties of glucomannan gels. *Food Hydrocolloids*, *60*, 437–444. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.015

Muyonga, J. ., Cole, C. G. ., & Duodu, K. . (2004). Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (Lates niloticus) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, *18*(4), 581–592. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2003.08.009

Norziah, M. H., Al-Hassan, A., Khairulnizam, A. B., Mordi, M. N., & Norita, M. (2009). Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, *23*(6), 1610–1616. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.004

Oztop, M. H., Rosenberg, M., Rosenberg, Y., McCarthy, K. L., & McCarthy, M. J. (2010). Magnetic resonance imaging (MRI) and relaxation spectrum analysis as methods to investigate swelling in whey protein gels. *Journal of Food Science*, *75*(8), 508–515. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01788.x

Pranoto, Y., Istigani, M., Santoso, U., Lestari, L. A., & Rohman, A. (2016). *Physicochemical Properties of*

*Gelatin Extracted from Fivelined Threadfin Bream ( Nemipterus tambuloides ) Skins*. *3*(November 2015), 92–97.

Renou, J. P., Foucat, L., & Bonny, J. M. (2003). Magnetic resonance imaging studies of water interactions in meat. *Food Chemistry*, *82*(1), 35–39. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00582-4

Sezer, P., Okur, I., Oztop, M. H., & Alpas, H. (2020). Improving the physical properties of fish gelatin by high hydrostatic pressure (HHP) and ultrasonication (US). *International Journal of Food Science and Technology*, *55*, 1468–1476. https://doi.org/10.1111/ijfs.14487

Sow, L. C., & Yang, H. (2015). Effects of salt and sugar addition on the physicochemical properties and nanostructure of fish gelatin. *Food Hydrocolloids*, *45*, 72–82. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.021

Tian, Y., Li, D., Zhao, J., Xu, X., & Jin, Z. (2014). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) on slowly digestible properties of rice starches. *Food Chemistry*, *152*, 225–229. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.11.162

Walkenström, P., & Hermansson, A. M. (1997). High-pressure treated mixed gels of gelatin and whey proteins. *Food Hydrocolloids*, *11*(2), 195–208. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80026-4

Yang, H., & Wang, Y. (2009). Effects of concentration on nanostructural images and physical properties of gelatin from channel catfish skins. *Food Hydrocolloids*, *23*(3), 577–584. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.04.016

# Ham balın süt proteinleri üzerine etkisinin elektroforetik olarak incelenmesi

Güzin Göksun SİVAS[1*], Ozan ÖZCAN[1], Begüm GÜREL GÖKMEN[1], Hava TASLAK[2], Sümeyye YILMAZ[1]
Tuğba TUNALI AKBAY[1]

[*1]Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, İstanbul, Türkiye

[2] İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

[*]Sorumlu yazar e-mail: sivasgoksun@gmail.com

## ÖZET

Süt zengin protein, laktoz ve yağ içeriği sayesinde besleyici bir gıda olarak kabul edilmekle birlikte, süte eklenen besinsel katkı maddelerinin sütün doğal kompozisyonu üzerine etkisi günümüzde araştırılmaya devam etmektedir. Süt proteinleri süte eklenen katkı maddelerinden en çok etkilenme potansiyeline sahip olan makro moleküllerdir. Süt proteinlerinin %80'i kazein, %20'si serum proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinler süte antioksidan, antikanserojen ve antimikrobiyal özellikler kazandırmaktadır. Antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip bir başka besin gıdası olan balın kimyasal bileşiminde yüksek oranda bulunan karbonhidratın yansıra protein, vitamin, organik asit, fenolik bileşikler ve serbest aminoasit gibi makro ve mikro bileşenler bulunmaktadır. Balın düşük protein içeriğinde albümin ve globülin gibi proteinlerin yanı sıra çeşitli aminoasitleri bileşiminde bulunduran bir gıdadır. Bu çalışmada ham bal eklenen keçi ve inek sütü örneklerindeki protein kompozisyonunun elektroforetik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çiğ inek ve keçi sütleri yerel bir çiftlikten, pastörize inek ve keçi sütleri ise sık kullanılan markalar arasından seçilmiştir. Keçi ve inek süt örnekleri çiğ, kaynatılmış, pastörize ve bunlara bal (75 mg/mL) eklenmiş olarak gruplara ayrılmıştır. Tüm süt örneklerinde Bradford yöntemi kullanılarak protein tayini yapılmıştır. Daha sonra kuyucuk başına 20 µg olacak şekilde örnekler SDS-poliakrilamid jele yüklenmiştir. Jel başına 30 mA elektrik akımı altında elektroforez işlemi uygulanmıştır. Kaynatma ile her iki süt proteinlerinde de % 9 civarında azalma meydana gelmiştir. Kaynatılan süte bal eklenmesi bazı protein bantlarının daha belirgin hale gelmesine neden olmuştur. Bal eklenmesi özellikle kazein ve laktalbumin fraksiyonu çevresindeki protein bantlarını belirgin hale getirmiştir. Süte eklenen balın sütün protein içeriğine olan katkısı protein tayini ile net olarak tespit edilemezken, elektroforez yöntemi kullanılarak aslında her iki süt türünün protein içeriğine katkısı olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Elektroforez, bal, süt proteinleri, kaynatma, pastörizasyon

## ABSTRACT

Although milk is considered a nutritious food thanks to its rich protein, lactose and fat content, the effect of nutritional additives on the natural composition of milk continues to be investigated today. Milk proteins are macromolecules that have the potential to be most affected by the the additives added to the milk. 80% of milk proteins are casein and 20% are serum proteins. These proteins provide antioxidant, anticancer and antimicrobial properties to the milk. Honey, another nutritional food with antimicrobial and antioxidant properties, contains macro and micro components such as protein, vitamin, organic acid, phenolic compounds, and free amino acid in addition to its carbohydrate content, which is found in high levels in the chemical composition of honey. In addition to the low protein content of honey such as albumin and globulin, it also contains various amino acids. In this study, it was aimed to investigate the protein composition of raw honey added goat and cow milk samples electrophoretically. For this purpose, raw cow and goat milk were obtained from a local farm, and pasteurized cow and goat milk were obtained among the frequently used brands. Goat and cow milk samples were divided into groups as raw, boiled, pasteurized and honey added (75 mg / mL) boiled and honey added pasteurized. The total protein level was determined in all milk samples using the Bradford method. The samples were then loaded onto the SDS-polyacrylamide gel at 20 µg per well. Electrophoresis was applied under an electric current of 30 mA per gel. With boiling, approximately a 9% decrease occurred in both milk proteins. Adding honey to the boiled milk has made some protein bands more prominent. The addition of honey has made the protein bands around the casein and lactalbumin fraction prominent. While the contribution of honey addition to the milk protein content cannot be determined by total protein determination, it was determined using the electrophoresis method.

**Keywords:** Electrophoresis, honey, milk proteins, boiling, pasteurization

## GİRİŞ

Süt; zengin protein, karbohidrat ve yağ içeriğine sahip olan ve yapısında mineraller ve vitaminleri de içeren önemli bir besin kaynağıdır. Süt proteinlerinin %80'i kazein proteinleri, %20'si serum (whey) proteinlerinden oluşmaktadır. Kazein fraksiyonundaki proteinler; α s1-kazein, α s2-kazein, β-kazein, κ-kazein, ve γ-kazeindir. Serum proteinleri ise α-laktalbumin, β-laktoglobulin, serum albümin, laktoferrin, immünoglobülinler, glikopeptitler ve peroksidazlardır (Grappin ve ark., 2003; Smithers ve ark., 2008).

Sütün sahip olduğu birçok biyolojik aktivite, makro ve mikro bileşenler elde edildiği kaynağa göre değişiklik göstermektedir. Yapılan araştırmalarda keçi sütünün, inek sütüne oranla daha çok protein içerdiği ancak keçi sütünde αs1-kazein ve β-laktalbumin proteinlerinin inek sütüne göre daha az olması nedeniyle daha az alerjenik özellik gösterdiği tespit edilmiştir. İnek sütü, çapı büyük olan yağ globülleri nedeniyle keçi sütüne göre daha zor sindirilir (Heine ve ark., 2002, Bevilacqua ve ark., 2001). Kolay sindirilebilmesi ve daha az alerjenik özellikleri nedeniyle keçi sütü bebeklere de verilebilmektedir.

Zengin besinsel içeriği nedeniyle günlük hayatımızda önemli bir yere sahip olan sütün tüketim şartları sağlık açısından büyük öneme sahiptir. Çiğ sütteki patojen mikroorganizmaların yok edilmesi sırasında besin değerlerinin korunabilmesi için uluslararası alanda kullanılan pastörizasyon ve UHT sterilizasyon gibi standart ısıl işlem uygulamaları mevcuttur. Ancak ülkemizde sıklıkla kullanılan bir diğer yöntem de sütün direkt üreticiden temin edilerek, evde kaynatıldıktan sonra tüketilmesidir. Bu kaynatma sırasında sütün bileşiminde yer alan protein, karbohidrat ve yağlar uygulanan yüksek ısıdan etkilenmektedir. Bu nedenle, sütün doğru şekilde işlenmiş, besin değerlerini kaybetmemiş halde sağlıklı olarak tüketilmesi besin değeri açısından önemlidir.

Bal; bileşiminde sağlık açısından faydalı birçok biyoaktif madde bulunduran, enerji değeri yüksek ve sindirimi kolay olan doğal besin kaynaklarından biridir (Mutlu ve ark., 2017) . % 65-80 şeker içeriğine sahip olan balın yapısında ayrıca, mineraller, vitaminler, polifenoller, aminoasidler ve proteinler de bulunmaktadır (Chua ve ark., 2015). Baldaki protein içeriğinin kaynağı arılar veya bitkiler olmakla birlikte yapısındaki protein oranı çoğunlukla % 0.5'ten düşüktür. Bu protein miktarı, balın cinsine göre değişiklik göstermektedir. Balın yapısında amino asitlerden prolin, lisin, histidin, arginin, aspartik asit, trionin, serin, glutamik asit, glisin, alanin, sistin, valin, metionin, izolösin, lösin, tirosin, fenilalanin, triptofan tespit edilmiştir ve bunlar arasında en belirgin olanı prolindir (Gheldof ve ark., 2002; Sorkun ve ark., 2002; Hermosín ve ark., 2003).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı; farklı ısıl işlem görmüş inek ve keçi sütü proteinlerini elektroforetik olarak incelemek ve balın ısıl işlem görmüş süt protein fraksiyonlarına etkisini tespit etmektir.

## MATERYAL VE METOT

### Süt Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmamızda keçi ve inek sütleri çiğ ve pastörize halde yerel bir firmadan alınmıştır. Tüm numunelerin yağı santrifüj ile uzaklaştırıldıktan sonra çiğ sütler 1 dakika süre ile kaynatılmıştır. Bal içeren süt örneklerinin hazırlanması sırasında kaynamış ve pastörize sütlere 75 mg/mL olacak şekilde ham bal eklenmiştir.

### Süt Örneklerinde Total Protein Tayini

Süt örneklerinin total protein tayini Bradford metodu (Bradford, 1976) kullanılarak yapıldı. Yağı uzaklaştırılmış olan süt örnekleri, % 0.01 g Coomassie Brilliant Blue içeren boya çözeltisi ile 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda numunelerde oluşan mavi rengin absorbansları 595 nm'de kaydedildi.

### Süt Örneklerinde Süt Proteinlerinin Elektroforetik İncelenmesi

Protein tayini yapılan süt örnekleri % 7,5 'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel kullanılarak elektroforetik olarak incelendi (Laemmli, 1970). Süt proteinleri, 5 mL gliserol (% 50 v/v), 0.5 mL 2-merkaptoetanol, 2 mL sodyum dodesil sülfat (SDS, % 10 w/v), 1 mL bromofenol mavi boyası (% 1 v/v) ve 0.9 mL distile su içeren 1 M Tris HCl (pH 6.8) çözeltisi ile karıştırıldı. 100°C lik su banyosunda 5 dakika inkübe edilerek denatüre edildi. Her jel kuyucuğuna 20 µg protein olacak şekilde denatüre edilmiş süt numuneleri yüklendi. Jel başına 30 mA elektrik akımı altında elektroforez işlemi yapıldı. Elektroforez işleminden sonra Commassie Brillant Blue içeren boyama çözeltisi ile boyandı. Boyanan jeller %10'luk asetik asit çözeltisi kullanılarak protein bantlarının belirginleştirilmesi sağlanarak oluşan protein bantları yorumlandı.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda elde ettiğimiz total protein tayini sonuçlarına göre uygulanan kaynatma işlemi sonucunda keçi sütü protein konsantrasyonundaki azalmanın inek sütündeki azalmadan daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Pastörize süt numunelerinde ise inek sütünün total protein konsantrasyonunun keçi sütü total protein konsantrasyonundan daha yüksek olarak bulunmuştur. Isıl işlem uygulanan keçi ve inek sütlerine bal eklenmesi total protein konsantrasyonunda hafif bir artışa neden olmuştur (Tablo 1).

**Tablo 1:** Isıl işlem görmüş keçi ve inek sütü örneklerinin total protein seviyeleri

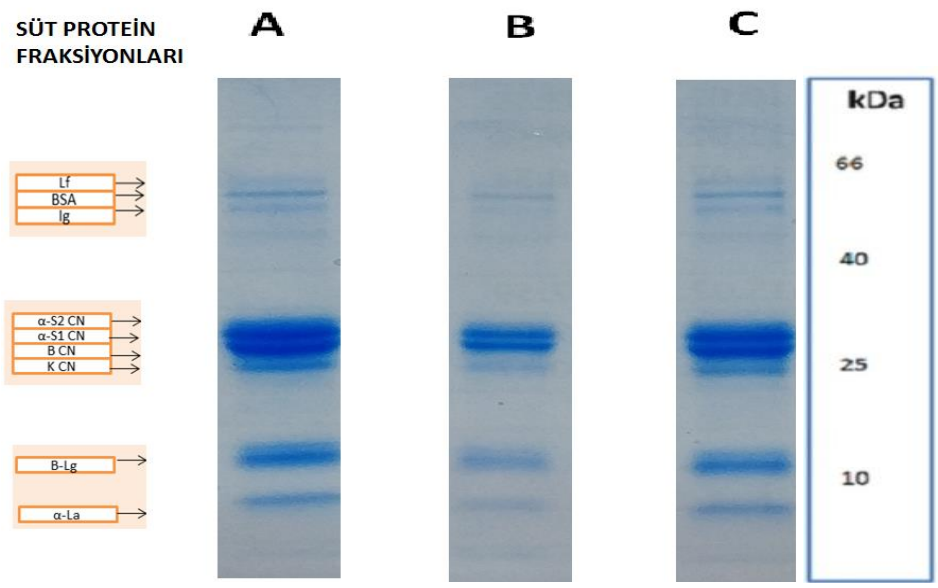
| **Total protein (g/dl)** | **Çiğ** | | **Kaynamış** | | **Pastörize** | | **Kaynamış ballı** | | **Pastörize ballı** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Ort** | **SD** | **Ort** | **SD** | **Ort** | **SD** | **Ort** | **SD** | **Ort** | **SD** |
| **Keçi sütü** | 5,47 | 0,02$^{a}$ | 3,81 | 0,02$^{bf}$ | 4,22 | 0,02$^{cfg}$ | 3,88 | 0,02$^{dfgh}$ | 4,27 | 0,02$^{efgı}$ |
| **İnek sütü** | 5,17 | 0,06 | 5,14 | 0,07 | 4,43 | 0,04$^{abd}$ | 5,22 | 0,05 | 4,51 | 0,02$^{abd}$ |

Sonuçlar ortalama(Ort) ve standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. $p<0.05$, n=8

**a:** çiğ inek sütüne göre anlamlı, **b:** kaynamış inek sütüne göre anlamlı, **c:** pastörize inek sütüne göre anlamlı, **d:** kaynamış ballı inek sütüne göre anlamlı, **e:** pastörize ballı inek sütüne anlamlı, **f:** çiğ keçi sütüne göre anlamlı **g:** kaynamış keçi sütüne göre anlamlı. **h:** pastörize keçi sütüne göre anlamlı **ı:** kaynamış ballı keçi sütüne göre anlamlı

Wada ve Lönnerdal (2014)'ın yaptığı çalışmada inek sütü ile yaptığı poliakrilamit jel elektroforezinde 20-41 kDa aralığında kazein fraksiyonunu tespit ederken, 10-20 kDa aralığında serum protein fraksiyonlarını tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak inek ve keçi sütü proteinlerinin elektroforezinde yaklaşık 25-40 kDa aralığında kazein fraksiyonu ve 10-25 kDa aralığında serum protein fraksiyonları tespit edilmiştir (Şekil 1 ve Şekil 2).

Kaynatma işlemi sonucunda keçi sütü total protein tayininde görülen azalma Şekil 1'deki SDS-poliakrilamit jel elektroforezi ile belirlenen bantlarda da gözlenmektedir. Keçi sütü α-S1kazein ve β-laktoglobulin proteinlerinde net bir şekilde görülen bu azalma (Şekil 1) nedeniyle kaynamış keçi sütünün, çiğ keçi sütüne göre daha kolay sindirilebilir ve daha az alerjen hale geldiği düşünülmektedir.

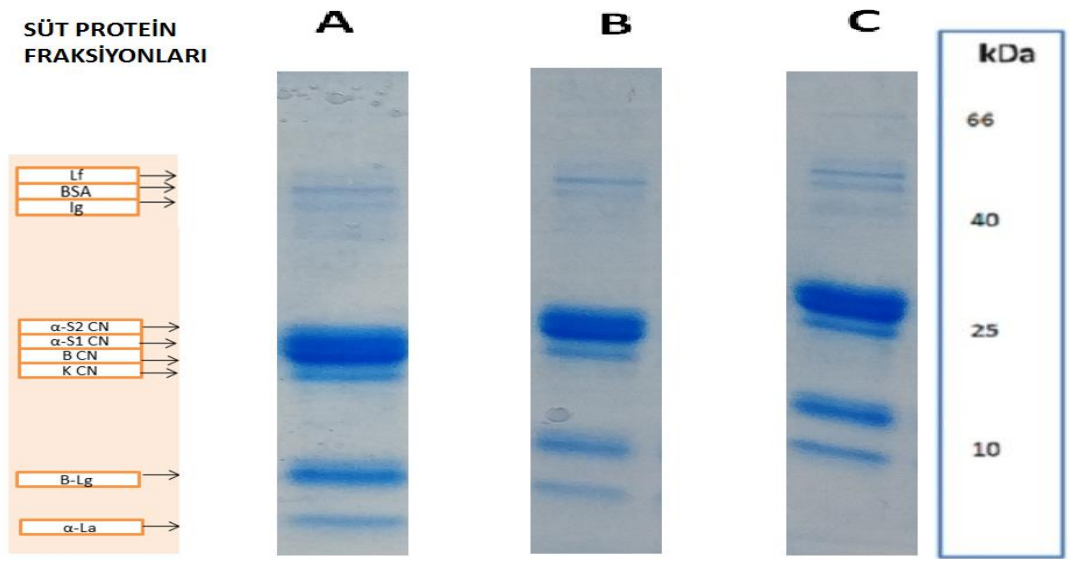



**Şekil 1:** Isıl işlemlerin keçi sütü proteinleri üzerine etkisi

**A:** Çiğ keçi sütü **B:** Kaynamış keçi sütü **C:** Pastörize keçi sütü
**Lf:** Laktoferrin **BSA:** Bovine serum albümin **Ig:** Immunoglobulin **CN:** Kazein **Lg**:Laktoglobulin **La:** Laktalbumin

Kaynamış ve pastörize keçi sütlerin jel elektroforezleri karşılaştırıldığında, kaynamış sütteki β-laktoglobulin ve α-laktalbumin fraksiyonlarının pastörize keçi sütüne göre daha düşük miktarda olduğu görülmektedir (Şekil 1). Pastörizasyon işlemi kaynatma işlemine göre daha kontrollü bir ısıl işlemdir. Dolayısıyla keçi sütü kazein fraksiyonunun, serum proteinlerine oranla pastörizasyondan daha az etkilendiği gözlenmektedir.

İnek sütünde kaynama işlemi sonucunda protein konsantrasyonundaki azalma total protein tayini ile çok net tespit edilemezken, Şekil 2'deki poliakrilamit jel elektroforezi ile protein profili tespit edilmiştir.

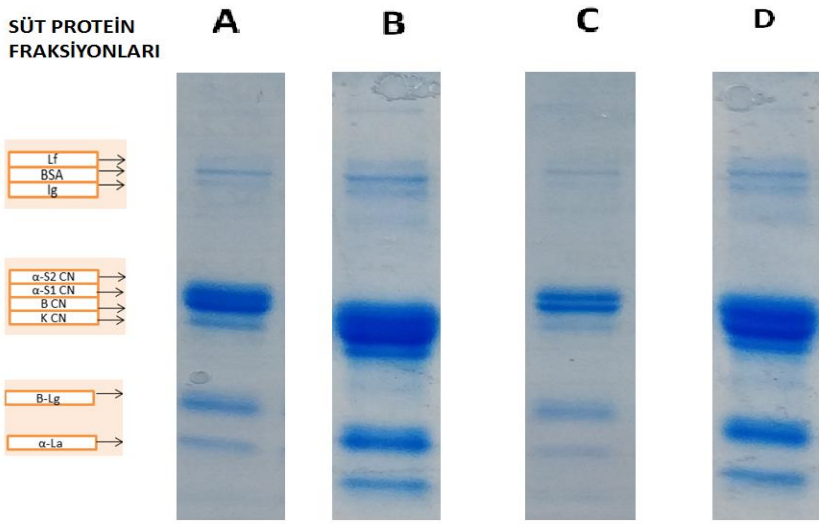



**Şekil 2:** Isıl işlemlerin inek sütü proteinleri üzerine etkisi

**A:** Çiğ inek sütü **B:** Kaynamış inek sütü **C:** Pastörize inek sütü
**Lf:** Laktoferrin **BSA:** Bovine serum albümin **Ig:** Immunoglobulin **CN:** Kazein **Lg**:Laktoglobulin
**La:** Laktalbumin

İnek sütü proteinlerinin ısıl işlemlerden keçi sütü proteinlerine göre daha az etkilenmesinin nedeninin inek sütündeki yağ globüllerinin keçi sütü yağ globüllerine nazaran daha büyük olması olduğu düşünülmektedir. İnek sütünün α-S1kazein ve β-laktoglobulin fraksiyonlarındaki azalma keçi sütüne göre daha azdır, kaynatma işlemi protein bantlarında azalmaya neden olurken pastörizasyon işleminde bu azalma kaynatma kadar olmamıştır (Şekil 2). Bunun nedeninin pastörizasyon işleminde süte uygulanan sıcaklığın kaynatmaya göre daha düşük olması olduğu düşünülmektedir.

Keçi ve inek sütüne bal eklenmesi ile bal proteinlerinin kaynamış sütte özellikle kazein ve serum protein fraksiyonları çevresindeki protein bantlarının daha belirgin hale gelmesine neden olmuştur (Şekil 3).

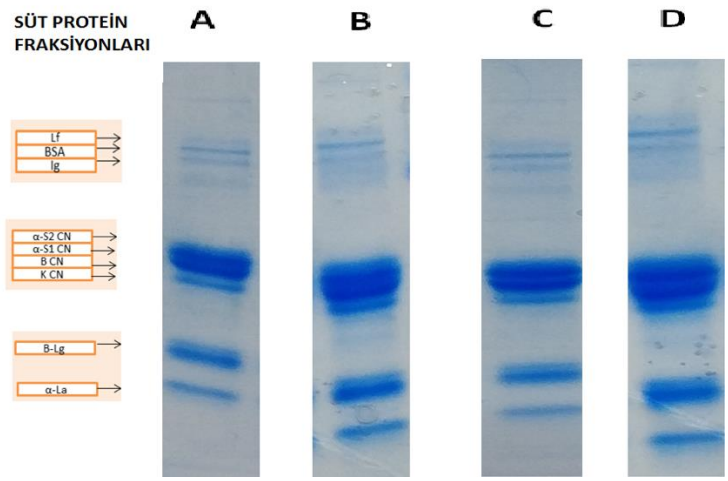



**Şekil 3:** Balın kaynamış keçi ve inek sütlerinin proteinleri üzerine etkisi

**A:** Kaynamış keçi sütü **B:** Kaynamış ballı keçi sütü **C:** Kaynamış inek sütü **D:** Kaynamış ballı inek sütü

**Lf:** Laktoferrin **BSA:** Bovine serum albümin **Ig:** Immunoglobulin **CN:** Kazein **Lg**:Laktoglobulin **La:** Laktalbumin

İnek sütü proteinlerindeki bu artış total protein tayini ile çok net tespit edilemezken, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile tespit edilmiştir (Şekil 3). Bu bulgu doğrultusunda, inek sütüne bal eklenmesinin süt proteinlerinin protein içeriğini düzenlediği görülmektedir. Süt örneklerine bal eklenmesi, kaynatma işlemi ile bozulan üç boyutlu protein yapısının tekrar eski haline getirdiği düşünülmektedir.




**Şekil 4:** Balın pastörize keçi ve inek sütlerinin proteinleri üzerine etkisi

**A:** Pastörize keçi sütü **B:** Pastörize ballı keçi sütü **C:** Pastörize inek sütü **D:** Pastörize ballı inek sütü

**Lf:** Laktoferrin **BSA:** Bovine serum albümin **Ig:** Immunoglobulin **CN:** Kazein **Lg**:Laktoglobulin **La:** Laktalbumin

Pastörize numunelere eklenen balın, keçi ve inek sütü protein artışına katkısı Şekil 4'de görülmektedir. Eklenen bal, inek sütü proteinlerinde keçi sütü proteinlerine göre daha fazla etki ederek bantların belirginleşmesini sağlamıştır.

Pastörize inek sütüne eklenen balın, pastörizasyon ile azalan kazein fraksiyonlarının tekrar eski haline gelmesini sağladığı ve çiğ inek sütünün protein elektroforezine benzer hale getirdiği gözlenmektedir. Marshall ve William (1987) farklı bal örneklerinin protein içeriğini SDS- poliakrilamit jel elektroforezi kullanarak belirledikleri çalışmalarında; 43-67 kDa molekül ağırlığı aralığında yoğun bir protein bandı ve ayrıca 20-30 kDa molekül ağırlığı aralığında da az miktarda protein bandı tespit etmişlerdir. Bu protein bantları da bizim çalışmamızdaki sırasıyla süt kazein ve serum proteinleri fraksiyonlarına denk gelmektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak; kaynatma işlemi hem keçi hem de inek sütü proteinlerini, pastörizasyon işlemine göre daha fazla azaltmıştır. Kaynatma işlemi sonrasında protein azalması en çok keçi sütünde olmuştur. Süte bal eklenmesi, ısıl işlem görmüş hem keçi hem de inek sütünde bozulan protein yapılarının tekrar eski haline gelmesini sağlamıştır. Bu nedenle ısıl işlem uygulanan süte bal eklenmesinin süt proteinlerine katkısı açısından göz önünde bulundurulması gerektiğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

Bevilacqua C, Martin P, Candalh C 2001. Goat's milk of defective αs1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to β-lactoglobulin in guinea pigs. Journal of Dairy Research, 68 (1): 217-227.

Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.

Chua LS, Lee JY, Chan GF 2015. Characterization of the Proteins in Hone,. Analytical Letters, 48: 697–709.

Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ 2002. Identification and quantification of an antioxidant components of honeys from various floral sources. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50: 5870–5877.

Grappin R, Dupont D, Pochet S, Lefier D 2011. Milk proteins/Analytical Methods. Encyclopedia of Dairy Science, 3: 741-750.

Heine,RG, Elsayed S, Clifford SH , Hilla DJ 2002. Cow's milk allergy in infancy Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2: 217-225.

Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. Food Chemistry, 83 (82): 263-268.

Laemmli UK 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 277: 680-685.

Marshall T, Williams KM 1987. Electrophoresis of Honey: Characterization of Trace Proteins from a Complex Biological Matrix by Silver Staining. Analytical Biochemistry, 167: 301-303.

Mutlu C, Erbaş M, Arslan TS 2017. Bal ve Diğer Arı Ürünlerinin Bazı Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Akademik Gıda, 15(1): 75-83.

Smithers GW 2008. Whey and whey proteins From 'gutter-to-gold' Food Science Australia, 18: 695– 704

Sorkun K, Doğan N, Gümüş Y, Ergün K, Bulakeri N, Işık N 2002. Türkiye'de üretilen doğal ve yapay balların ayırt edilmesinde fiziksel, kimyasal ve mikroskobik analizleri. Mellifera, 2 (4) : 13–21.

Wada Y, Lönnerdal B 2014. Effects of Different Industrial Heating Processes of Milk on Site-Specific Protein Modifications and Their Relationship to in Vitro and in Vivo Digestibility. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62: 4175−4185.

# Total organic carbon and chemical oxygen demand ratio of surface waters in Konya basin

Sevtap KARAKURT

*General Directorate of State Hydraulic Works, 4th Regional Directorate, Konya TURKEY

skarakurt@dsi.gov.tr

## Abstract

Total organic carbon (TOC) and chemical oxygen demand (COD) results are assessed as the organic pollution indicator in the water bodies, TOC being a more reliable indicator recently. Total organic carbon is defined as the organic carbon content of the water while chemical oxygen demand is defined as the amount of oxygen that is required for the oxidation of organics. High levels of both of them are the measures of the high organic concentrations in the water samples. When the maximum allowable concentrations are inquired, although TOC or COD is not directly of concern, due to the formation of hazardous effected disinfection by-products, they are not expected to be in high concentrations. TOC:COD ratio is a measure for the oxidation state of the carbon compounds and is a specific characteristic of the subject water sample. In this study, three water bodies from Konya basin were selected and analyzed at different seasons for the evaluation according to the TOC:COD ratios between 2015 and 2019. The selected water bodies executed similar ranges of TOC:COD ratios together with similar responses to seasonal changes.

**Keywords:** Total organic carbon, Chemical oxygen demand, Oxidation state, Konya Basin.

## INTRODUCTION

Organic materials including simple sugar, proteins, fats and organic acids in soils and surface water is widely distributed over the earth (Zhang, et al. 2019). In surface water the carbon can be present in three form; elemental, inorganic and organic (Kohler, et al. 2000). Besides, contamination of surface water due to anthropogenic activities may also increase the organic compound. Determination of total organic compound (TOC) and chemical organic compound (COD) possesses crucial importance for the quality of water (Varol 2019). The term total organic carbon (TOC) is used for the total amount of organic carbon exist in water. It can also be used to determine water pollution caused by organic matter. As a result of oxidation of organic substances in water, carbon dioxide is formed. The amount of carbon dioxide is determined through TOC (Han-Saem Lee 2020). On the other hand, chemical oxygen demand (COD) is the most important test parameter used in determining the degree of pollution in water and wastewater samples. Chemical oxygen demand is an effective method used to measure the amount of electrons exist in organic carbon in water to reduce oxygen. Total organic carbon is a criterion for the reduction of carbon compounds. The link between COD and TOC is directly proportional to the amount of organic compound oxidized with $CO_2$ and the total amount of organic carbon in water. This is because it uses organic carbons in the water as the carbon source for the reduction of chemical oxygen in water (Izadi, et al. 2018).

## MATERIALS AND METHODS

TOC analysis were made according to TS 8195 EN 1484 by UV-persulfate oxidation. Samples were acidified by phosphoric acid to pH<2 in order to remove inorganic carbon by sparging. And the organic carbon content of the sample was oxidized by UV-persulfate digestion and resulting carbondioxide absorbance was detected by NDIR detector and quantified by using the relevant calibration curve prepared by potassium hydrogen phthalate.

COD analysis were made by test kits according to the procedure of the kits based on the oxidation by potassium dichromate. After digestion at the thermoreactor, the COD results were received from the screen of the UV-visible spectrophotometer.

## RESULTS

Three water bodies of differing TOC concentrations from Konya city of Turkey were selected as sources of water bodies and their TOC and COD values were determined by the methods TS 8195 EN 1484 and test kits respectively which reveals the TOC:COD ratios between 2015 and 2019.

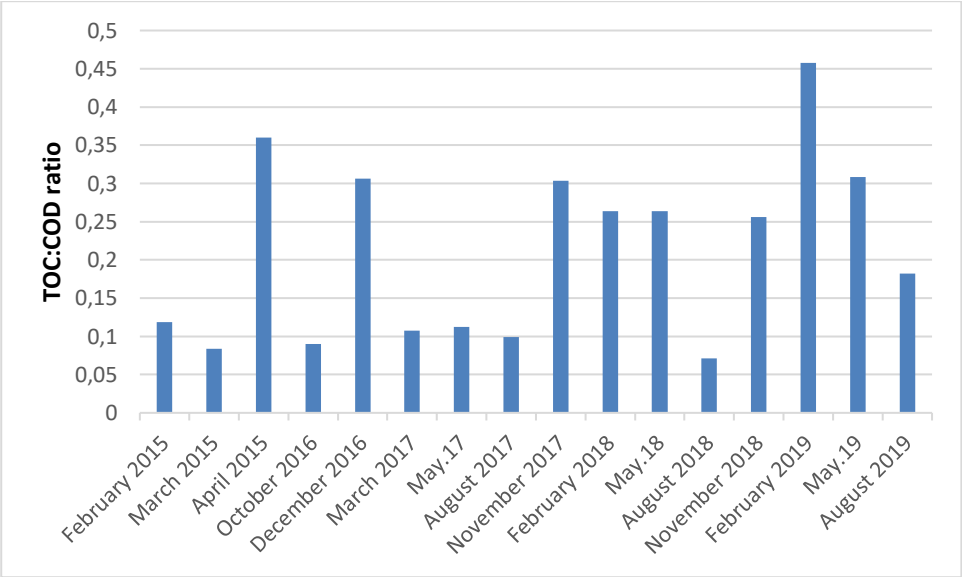



*Figure 13 TOC:COD ratios of the 1st sampling point between 2015 and 2019*

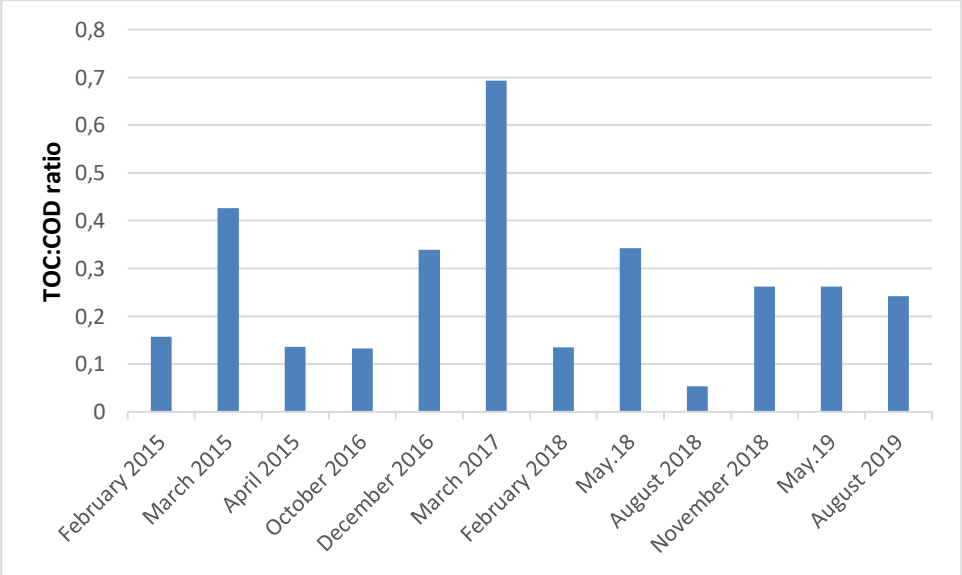



*Figure 14 TOC:COD ratios of the 2nd sampling point between 2015 and 2019*

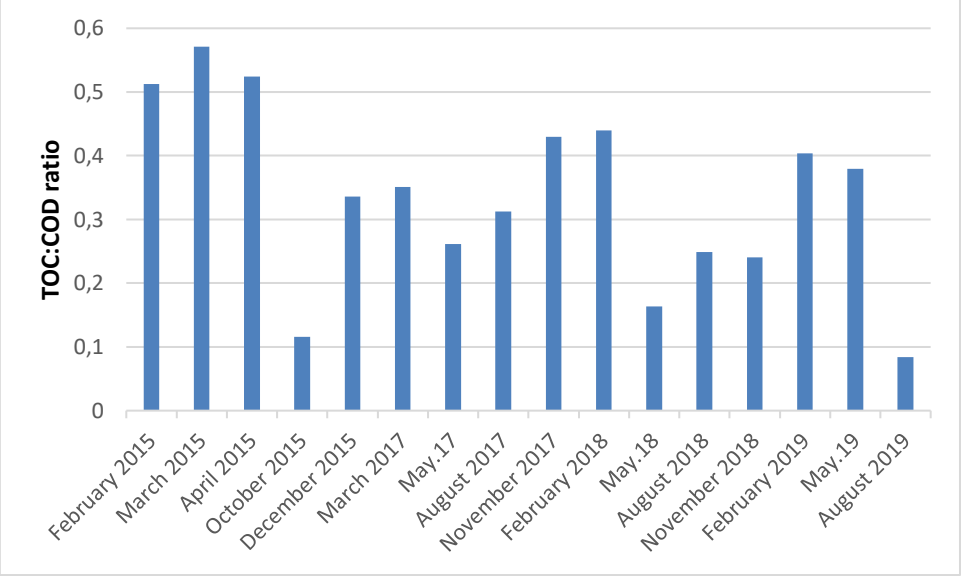



*Figure 15 TOC:COD ratios of the 2nd sampling point between 2015 and 2019*

*Table 7 TOC:COD ratio ranges of the selected sampling points*

| Sampling point | Water body | Minimum TOC:COD | Maximum TOC:COD | Average TOC:COD |
|---|---|---|---|---|
| **1** | Beyşehir Yeşildağ village road-bridge (n=16) | 0.072 | 0.458 | 0.211 |
| **2** | Karaman İbrala Dam entrance (n=12) | 0.054 | 0.693 | 0.265 |
| **3** | Seydişehir Karacaören village road-bridge (n=16) | 0.084 | 0.571 | 0.336 |

## CONCLUSION

The selected water bodies of Konya basin executed similar ranges of TOC:COD ratios together with similar responses to seasonal changes. The ratio is specific to the subject water and is a characteristic property due to the organic content of the water sample. In order to characterize the basin in details, other sampling points in the basin should be inquired and TOC:COD map of the basin should be drawn.

## REFERENCES

Han-Saem Lee JH, Hyun-Sang Shin 2020. Enhancing the total organic carbon measurement efficiency for water samples containing suspended solids using alkaline and ultrasonic pretreatment methods. Journal of Environmental Sciences, 90:20-28

Izadi A, Hosseini M, Najafpour Darzi G, Nabi Bidhendi G, Pajoum Shariati F 2018. Treatment of paper-recycling wastewater by electrocoagulation using aluminum and iron electrodes. J Environ Health Sci Eng, 16:257-264

Kohler S, Laudon H, Wilander A, Bishop K 2000. Estimating organic acid dissociation in natural surface waters using total alkalinity and TOC. Water Res, 34:1425-1434

Varol M 2019. Spatio-temporal changes in surface water quality and sediment phosphorus content of a large reservoir in Turkey. Environ Pollut, 259:113860

Zhang HL, Jiang WL, Liu R, Zhou Y, Zhang Y 2019. Organic degradation and extracellular products of pure oxygen aerated activated sludge under different F/M conditions. Bioresour Technol, 279:189-194

# Üniversite öğrencilerinde beden algısının değerlendirilmesi

Feride AYYILDIZ[1], Hilal YILDIRAN[1]

*[1]Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail:feridecelebi_dyt@hotmail.com

## Özet

Beden algısı, bireyin kendi vücudunu algılama şeklidir. Bireyin sahip olduğu vücut yapısı, algıladığı vücut yapısı ve idealindeki vücut yapısı arasındaki farklar arttıkça beden memnuniyetsizliği artmaktadır. Bu tanımlamada algılanan vücut yapısı kavramı önemlidir. Çünkü zayıf olduğu halde kendini obez olarak tanımlayan bireyler mevcuttur. Bu çalışma Sağlık Bilimleri Fakültesi'nin farklı bölümlerinde eğitim gören kız öğrencilerin beden algılarının değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır. Çalışmaya Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi'nin üç farklı bölümünde (beslenme ve diyetetik, fizyoterapi ve rehabilitasyon ve hemşirelik) eğitim gören 305 kız öğrenci dahil edilmiştir. Bireylerin boy uzunluğu, vücut ağırlığı ve beden kütle indeksi (BKİ) değerlendirilip aynı zamanda bireylerin kendi vücudunu nasıl algıladığı öğrenebilmek amacıyla beden algısı ölçeği kullanılmıştır. Bölümlere göre BKİ dağılımına bakıldığında; Beslenme ve Diyetetik bölümünde okuyan öğrencilerin BKİ ortalaması 22.1±2.87 kg/m$^2$, fizyoterapi ve rehabilitasyon bölümünde okuyan öğrencilerin BKİ ortalaması 21.9±3.26 kg/m$^2$, hemşirelik bölümünde okuyan öğrencilerin BKİ ortalaması 21.5±2.77 kg/m$^2$'dir. Beslenme ve Diyetetik bölümünde BKİ sınıflaması normal olan bireylerin %32.3'ü kendisini zayıf, %6.0'sı kendisini fazla kilolu olarak görmektedir. Zayıf olan bireylerin %33.3'ü kendisini normal olarak tanımlarken; fazla kilolu olanların %60.8'i kendisini normal beden imajına sahip, %26.0'sı zayıf olarak tanımlamaktadır. Fizyoterapi ve Rehabilitasyon bölümündeki öğrenciler BKİ sınıflaması normal olan bireylerin, %37.7'si kendisini zayıf, %21.3'ü kendisini fazla kilolu zayıf olan bireylerin %33.3'ü kendisini normal, %66.7'si zayıf beden; sınıflaması fazla kilolu olan bireylerin ise %66.7'si normal olarak değerlendirmektedir. Hemşirelik bölümü öğrencileri ise, BKİ sınıflaması normal olan bireylerin %38.2'si zayıf beden, %7.7'si kendisini fazla kilolu; zayıf olan bireylerin %23.1'i kendisini normal; fazla kilolu olan bireylerin %54.6'sı normal, %9.1'i zayıf olarak değerlendirmektedir. Beden algısı bozukluklarının ve yeme bozukluklarının kadınlarda daha fazla görüldüğü bilinen bir gerçektir. Bu çalışmada da bireylerin gerçek vücut ağırlığı ile algıladıkları vücut ağırlıkları arasında farklılıkların olduğu göze çarpmaktadır. Öğrencilere eğitim hayatı boyunca sağlıklı besin seçimi, sağlıklı beslenme ve sağlıklı vücut ağırlığı hakkında verilecek eğitimler özellikle medyanın oluşturduğu beden algısından korunmada olumlu katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** beden algısı, beslenme, sağlık

## Abstract

Body perception is the way of individual perceives his own body. Body dissatisfaction increases as the differences among the body structure of the individual, the body structure perceived and the body structure in the ideal increases. The concept of perceived body structure is important in this definition. Because there are individuals who define themselves as obese even though they are underweight. This study was planned to evaluate the perception of the body of female students studying in different departments in Faculty of Health Sciences. In the study, 305 female students from three different departments (nutrition and dietetics, physiotherapy and rehabilitation and nursing) who were educated at Gazi University Faculty of Health Sciences were included. In present study, individuals' height, body weight and body mass index (BMI) were evaluated. At the same time, the body perception scale was used to learn how individuals perceive their own body. The mean BMI of the students studying in the department of nutrition and dietetics was 22.1 ± 2.87 kg / m$^2$, physiotherapy and rehabilitation was 21,9±3.26 kg/m$^2$, nursing was 21.5±2.77 kg/m$^2$. In department of nutrition and dietetics, 32.3% of students with normal BMI consider themselves underweight and 6.0% of them consider themselves overweight. In addition, 33.3% of the underweight individuals defined themselves as normal; 60.8% overweight individuals defined themselves as normal, while 26.0% of them define as underweight.In the department of physiotherapy and rehabilitation, students whose BMI was normal, 37.7% of described themselves as underweight, 21.3% of them described themselves as overweight. Also, 33.3% of individuals whose BMI was underweight, defined as normal, 66.7% of them defined as underweight; 66.7% of individuals whose classification was overweight consider normal weight. In addition, 38.2% of nursing students whose BMI was normal described themselves as underweight, 7.7% of them as overweight; 23.1% of

individuals whose BMI classification was underweight defined themselves as normal; 54.6% of individuals whose BMI was overweight considered normal and 9.1% them as underweight. It is a known fact that body perception disorders and eating disorders are more common in women. In this study, it is striking that there are differences between individuals' real body weight and perceptions.Trainings to be given to students about healthy food selection, healthy nutrition and healthy body weight throughout their education life will contribute positively to protection from the body perception created by the media.

**Key words:** body perception, nutrition, health

## GİRİŞ

Günümüzde genç nüfus biyolojik ve psikososyal pek çok sağlık sorunu ile karşı karşıya kalmaktadır. Ancak bunların arasında sağlıksız ve dengesiz beslenme alışkanlığına bağlı olarak gelişen hastalıklar ilk sırada yer almaktadır (Demirezen ve Coşansu, 2005). Gençlik döneminde beslenmenin yeterli ve dengeli olması büyük önem taşımaktadır (Vançelik ve ark., 2007). Bu dönemde bireylerin vücut ağırlığıyla ilişkili kaygıları onları yeme bozukluklarına (anoreksiya nervosa gibi) sürükleyebilmektedir. Özellikle sosyal ve medya aracılı baskılar gençlerde belli bir beden algısı oluşturmaktadır (Türk ve ark.,2007). Medya yoluyla oluşturulan zayıf olmanın güzel ya da yakışıklı olmayı sağladığı algısından kaynaklı beden algısı değişebilmektedir (Tezcan,2009).

Beden algısı, bireyin kendi vücudunu algılama şeklidir. Bireyin sahip olduğu vücut yapısı, algıladığı vücut yapısı ve idealindeki vücut yapısı arasındaki farklar arttıkça beden memnuniyetsizliği artmaktadır. Bu tanımlamada algılanan vücut yapısı kavramı önemlidir. Çünkü zayıf olduğu halde kendini obez olarak tanımlayan bireyler mevcuttur. Tam tersine obez olan bireylerin kendini zayıf olarak görme durumları da ortaya çıkabilmektedir (Demir, 2006). Geç ergenlik döneminin yaşandığı 17-20 yaş döneminde dış görünüşün kişilerin daha fazla ilgi odağında olduğu, kişilerin bu dönemde bedeninin görünüşü ile ilgili daha fazla tedirginlik yaşadığı görülmüştür. Ülkemizde yapılmış bir çalışmada, beden algısı kadınlarda erkeklere göre daha düşük bulunmuştur (Acar, 2010). Bu çalışma farklı bölümlerde eğitim gören kız öğrencilerin beden algılarının değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi'nde eğitim gören üç farklı bölümden (beslenme ve diyetetik, fizyoterapi ve rehabilitasyon ve hemşirelik) 305 kız öğrenci dahil edilmiştir. Çalışmada bireylerin boy uzunluğu, vücut ağırlığı ve beden kütle indeksi (BKİ) değerlendirilmiştir. Bireylerin BKİ değerleri Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre sınıflanmıştır (Tablo 1) (WHO, 2020).

**Tablo1.** Dünya Sağlık Örgütü Beden Kütle İndeksi sınıflaması

| **BKİ (kg/m$^2$)** | **Sınıflama** |
|---|---|
| <18.5 | Zayıf |
| 18.5–24.9 | Normal |
| 25.0–29.9 | Fazla kilolu (pre-obez) |
| >30.0–34.9 | 1. Derecede obez |
| 35.0–39.9 | 2. Derecede obez |
| > 40 | 3. Derecede obez |

Aynı zamanda bireylerin kendi vücudunu nasıl algıladığı öğrenebilmek amacıyla beden algısı ölçeği kullanılmıştır. Bireylerin kendi vücudunu nasıl algıladığı ve dış görünüşü hakkındaki düşüncelerini öğrenebilmek amacıyla 'Vücut Figürü Skalası'kullanılmıştır (Stunkard ve ark, 1983). Bireylerin verdiği cevaplarda; 1-2 numaralı şekli seçenlerin "zayıf", 3-4 numara "normal", 5-6-7 numara "hafif kilolu", 8-9 numarayı seçenlerin ise "obez" algısında olduğu şeklinde değerlendirme yapılmıştır (Stunkard ve ark, 1983).

İstatistiksel analizler SPSS (IBM SPSS Statistics 20.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Bulguların yorumlanmasında frekans tabloları ve tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Geç ergenlik döneminin yaşandığı 17-20 yaş döneminde dış görünüşün kişilerin daha fazla ilgi odağında olduğu, kişilerin bu dönemde bedeninin görünüşü ile ilgili daha fazla tedirginlik yaşadığı görülmüştür (Acar, 2010). Ayrıca ülkemizde yapılmış bir çalışmada, beden algısı kadınlarda erkeklere göre daha düşük bulunmuştur (Acar, 2010). Bu çalışmada ise farklı bölümlerde eğitim gören kız öğrencilerin beden algıları değerlendirilmiştir. Bölümlere göre BKİ dağılımına bakıldığında; Beslenme ve Diyetetik bölümünde okuyan öğrencilerin BKİ ortalaması 22.1±2.87 kg/$m^2$, fizyoterapi ve rehabilitasyon bölümünde okuyan öğrencilerin BKİ ortalaması 21.9±3.26 kg/$m^2$, hemşirelik bölümünde okuyan öğrencilerin BKİ ortalaması 21.5±2.77 kg/$m^2$'dir (Tablo 2).

Yapılan bir çalışmada normal ağırlıkta olan kızların çoğunun kendisini zayıf veya çok zayıf gördüğü belirlenmiştir. Normal ağırlıktaki kızların %35.5'inin ve fazla kilolu kızların %46.9'unun kendisini olduğu BKİ aralığında algıladığı görülmüştür (Devran, 2014). Bireylerin cinsiyete ve eğitim gördükleri bölümlere göre beden algılarının değerlendirilmesi Tablo 3'te verilmiştir. Beslenme ve Diyetetik bölümünde BKİ sınıflaması normal olan bireylerin %32.3'ü kendisini zayıf, %6.0'sı kendisini fazla kilolu olarak görmektedir. Zayıf olan bireylerin %33.3'ü kendisini normal olarak tanımlarken; fazla kilolu olanların %60.8'i kendisini normal beden imajına sahip, %26.0'sı zayıf olarak tanımlamaktadır. Fizyoterapi ve Rehabilitasyon bölümündeki öğrenciler BKİ sınıflaması normal olan bireylerin, %37.7'si kendisini zayıf, %21.3'ü kendisini fazla kilolu; zayıf olan bireylerin %33.3'ü kendisini normal, %66.7'si zayıf beden; sınıflaması fazla kilolu olan bireylerin ise %66.7'si normal olarak değerlendirmektedir. Hemşirelik bölümü öğrencileri ise, BKİ sınıflaması normal olan bireylerin %38.2'si zayıf beden, %7.7'si kendisini fazla kilolu; zayıf olan bireylerin %23.1'i kendisini normal; hafif şişman olan bireylerin %54.6'sı normal, %9.1'i zayıf olarak değerlendirmektedir. Başkent Üniversitesi'nde yürütülen bir çalışmada. normal ağırlıkta olan kızların çoğunun kendisini zayıf veya çok zayıf gördüğü belirlenmiştir. Normal ağırlıktaki kızların %35.5'inin ve fazla kilolu kızların %46.9'unun kendisini olduğu BKİ aralığında algıladığı görülmüştür (Devran 2014). Kadınların vücut ağırlıklarını gerçek vücut ağırlıklarından daha düşük ya da daha yüksek algıladığını gösteren çalışmalar bulunmakta ve bu durumun kadınların duygu durum değişiklikleri, çevresel etmenler ve sosyal çevreden daha fazla etkilenmesi ile ilişkili olabileceği düşündürmektedir (Kagawa, 2007; Alwan, 2010). Bu çalışmada çalışmaya katılan bireylerin olduğu vücut ağırlıklarıyla beden algıları arasında farklar olduğu görülemektedir.

## SONUÇ

Beden algısı bozukluklarının ve yeme bozukluklarının kadınlarda daha fazla görüldüğü bilinen bir gerçektir. Eğitim görülen bölümler arasında BKİ ve beden algısına göre anlamlı farklılıklar saptanmamıştır. Bu çalışmada da bireylerin gerçek vücut ağırlığı değerlendirmesiyle algıladıkları arasında farklılıkların olduğu göze çarpmaktadır. Öğrencilere eğitim hayatı boyunca sağlıklı besin seçimi, sağlıklı beslenme ve sağlıklı vücut ağırlığı hakkında verilecek eğitimler özellikle medyanın oluşturduğu beden algısından korunmada olumlu katkı sağlayacaktır.

**Tablo 2.** Bireylerin eğitim gördükleri bölümlere ve cinsiyete göre antropometrik ölçümlerinin değerlendirilmesi

| | **Beslenme ve Diyetetik** | | | | **Fizyoterapi ve Rehabilitasyon** | | | | **Hemşirelik** | | | | **Toplam** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Min | Max | $\bar{x}$ | SS | Min | Max | $\bar{x}$ | SS | Min | Max | $\bar{x}$ | SS | Min | Max | $\bar{x}$ | SS |
| Yaş | 17 | 36 | 21.6 | 2.11 | 18 | 30 | 21.0 | 1.76 | 18 | 27 | 20.9 | 1.50 | 17 | 36 | 21.2 | 1.87 |
| Boy(cm) | 150.0 | 192.0 | 162.9 | 6.55 | 149 | 185 | 161 | 5.37 | 19 | 185 | 162.7 | 5.95 | 149 | 192 | 162.6 | 6.08 |
| Vücut ağırlığı (kg) | 42.0 | 98.0 | 58.9 | 9.24 | 40.0 | 90.0 | 57.3 | 9.00 | 41 | 81 | 57.2 | 8.64 | 40 | 90 | 57.9 | 9.00 |
| BKİ (kg/m$^2$) | 16 | 32 | 22.1 | 2.87 | 16 | 33 | 21.9 | 3.26 | 16 | 32 | 21.5 | 2.77 | 16 | 33 | 21.9 | 2.95 |

*BKİ: Beden Kütle İndeksi

**Tablo 3.** Bireylerin cinsiyete ve eğitim gördükleri bölümlere göre beden algılarının değerlendirilmesi

| | **Beden imajı algısı** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Bölümlere göre BKİ Sınıflaması** | **Zayıf** | | **Normal** | | **Fazla kilolu** | | **Obez** | | **Toplam** | |
| | S | % | S | % | S | % | S | % | S | % |
| **Beslenme ve Diyetetik (n:132)** | | | | | | | | | | |
| Zayıf | 6 | 66,67 | 3 | 33,33 | - | - | - | - | 9 | 100 |
| Normal | 32 | 32,32 | 61 | 61,62 | 6 | 6,06 | - | - | 99 | 100 |
| Fazla kilolu | 6 | 26,09 | 14 | 60,87 | 3 | 13,04 | - | - | 23 | 100 |
| 1. Derecede obez | - | - | - | - | 1 | 100 | - | - | 1 | 100 |
| **Fizyoterapi ve Rehabilitasyon (n:80)** | | | | | | | | | | |
| Zayıf | 6 | 66,67 | 3 | 33,33 | - | - | - | - | 9 | 100 |
| Normal | 23 | 37,70 | 25 | 40,98 | 13 | 21,31 | - | - | 61 | 100 |
| Fazla kilolu | - | - | 4 | 66,67 | 2 | 33,33 | - | - | 6 | 100 |
| 1. Derecede obez | 1 | 25,00 | 1 | 25,00 | 2 | 50,00 | - | - | 4 | 100 |
| **Hemşirelik (n:93)** | | | | | | | | | | |
| Zayıf | 9 | 69,23 | 3 | 23,08 | 1 | 7,69 | - | - | 13 | 100 |
| Normal | 26 | 38,24 | 30 | 44,12 | 12 | 17,65 | - | - | 68 | 100 |
| Fazla kilolu | 1 | 9,09 | 6 | 54,55 | 4 | 36,36 | - | - | 11 | 100 |
| 1. Derecede obez | 1 | 100 | - | - | - | - | - | - | 1 | 100 |

*BKİ: Beden Kütle İndeksi

## KAYNAKLAR

Acar ÖT 2010. Kocaeli üniversitesi beden eğitimi Y.O. ve mimarlık mühendislik fak. öğrencilerinde beden algısı ve iyilik halinin beden kitle indeksi ve vücut yağ dağılımı ile ilgisi. Uzmanlık tezi, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi.

Alwan H, Viswanathan B, Williams J, Paccaud F, Bovet P 2010. Association between weight perception and socioeconomic status among adults in the Seychelles. BMC Public Health,10(1):467.

Arıca S, Arıca V, Arı M, Özer C 2011. Adölesanda yeme bozuklukları. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi. 2(5):1-10.

Demir BD 2006. Liseye devam eden kız öğrencilerin beslenme alışkanlıkları ve beden algısını etkileyen etmenler. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Ankara.

Demirezen E, Coşansu G 2005. Adölesan çagı ögrencilerde beslenme alıskanlıklarının degerlendirilmesi. STED, 14(8):174-178.

Devran BS 2014. Doğu Anadolu Bölgesinde yaşayan adölesan ve yetişkinlerin beslenme alışkanlıkları ile yeme tutum ve davranışlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi, Ankara.

Kagawa M, Kuroiwa C, Uenishi K, Mori M, Dhaliwal S, Hills P 2007. A comparison of body perceptions in relation to measured body composition in young Japanese males and females. Body Image, 24(4):372-80.

Stunkard AJ, Sørensen T, Schulsinger F 1983. Use of the Danish Adoption Register for the study of obesity and thinness. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis, 60:115-20.

Tezcan B 2009. Obez bireylerde benlik saygisi, beden algısı ve travmatik geçmiş yaşantılar. Uzmanlık Tezi. Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanes İstanbul.

Türk M, Gürsoy ST, Ergin I 2007. Kentsel bölgede lise birinci sınıf öğrencilerinin beslenme alıskanlıkları. Genel Tıp Dergisi, 17(2):81-87.

Vançelik S, Önal SG, Güraksın A, Beyhun E 2007. Üniversite öğrencilerinin beslenme alışkanlıkları ve ilişkili faktörler. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni,6(4):242-248.

WHO 2020. BMI classification. Avaliable at: http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi [04.04. 20]

# Üniversite öğrencilerinin öğün tüketim durumları ve tercihlerinin değerlendirilmesi
# Evaluation of meal consumption status and preferences in university students

Feride AYYILDIZ[1], Hilal YILDIRAN[1]

*[1]Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail:feridecelebi_dyt@hotmail.com

## Özet

Üniversite öğrencilerinin doğru beslenme alışkanlıklarına sahip olması toplumsal önem taşımaktadır. Üniversite yaşamı başladığında yeni bir çevreye uyumda zorlanma ve ekonomik yetersizliklere yetersiz ve dengesiz beslenme eklendiğinde öğrencilerin beslenme nedenli sağlık sorunları artabilmektedir. Bu çalışma üniversite öğrencilerinde öğün tüketim durumlarının ve öğün tercihlerinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Çalışmaya Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi'nde eğitim gören 306 kadın ve 136 erkek olmak üzere toplam 442 genç yetişkin birey katılmıştır. Bireylerin beslenme alışkanlıklarını değerlendirmek amacıyla ana ve ara öğün sayıları, ana öğünlerde sıklıkla tükettikleri besinler ve öğünlerin tüketildiği yerler sorgulanmıştır. Kız öğrencilerin %11.8'i, erkek öğrencilerin ise %16.9'u kahvaltı yapmadığını bildirmiştir. Kızların %27'si, erkeklerin %48.7'si kahvaltıda simit-poğaça tercih ederken, kızlarda ve erkeklerde en fazla peynir (sırasıyla %84.4 ve %69.9) tercih edilmektedir. Kızların %13.4'ü, erkeklerin ise %6.6'sı öğle yemeği tüketmemektedir. Öğle yemeği için her iki cinsiyette de en fazla tercih edilen yer okul yemekhanesi olup, restaurant/cafe gibi işletmeleri tercih edenlerin oranı kızlarda %4.9, erkeklerde ise %11.8 olarak belirlenmiştir. Öğle yemeğinde fast food tercih edenlerin oranı kızlarda %15.1 iken erkeklerde %23.6 olarak belirlenmiştir. Akşam yemeği tüketmeyenlerin oranı ise kızlarda sadece %1, erkeklerde %2.3 olarak bildirilmiştir. Akşam yemeğinde her iki cinsiyette fazla tercih edilen yer yurt yemekhanesi iken (kızların %57.4, erkeklerin %49.6), fast food tercih edenlerin oranı kızlarda %12.9, erkeklerde %36.1 olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada üniversite öğrencilerinin restaurant/cafe yiyecekleri veya fast-food tüketme alışkanlığı oldukça düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Bireylerde öğün atlama oranın da düşük olması dikkat çekmektedir. Bu sonuca ulaşmada, öğrenim gördükleri sağlık alanındaki bilgi düzeyleri sebep gösterilebilir. Ancak kahvaltıda tüketilen simit-poğaça gibi besinlerin azaltılması, bunun yanı sıra sabah kahvaltı alışkanlığı kazandırılması bireylerin enerji alımını dengelemekle kalmayıp yeterli ve dengeli beslenmesine de katkı sağlayacaktır. Öğrencilerin beslenme sorunlarının tespit edilip, yanlış beslenme tercihleri yerine doğru beslenme alışkanlıklarının kazandırılması hedeflenmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** beslenme alışkanlıkları, besin tercihleri, öğün tüketimi

## Abstract

University students having the right eating habits have social importance. When difficulties in adapting to a new environment and economic inadequacies are added to inadequate and unbalanced nutrition, nutrition related health problems of students may increase. This study was planned to determine meal consumption status and meal preferences in university students. A total of 442 young adult individuals, 306 women and 136 men, participated in this study at Gazi University Faculty of Health Sciences. In order to evaluate the eating habits of individuals, the number of main and snacks, foods consumed frequently in main meals and the places where meals are consumed were questioned. In present study, 11.8% of female students and 16.9% of male students reported that they didn't have breakfast. While 27% of female and 48.7% of male prefer to eat bagel-pastries for breakfast and cheese is the most preferred for female and male (84.4% and 69.9% respectively). 13.4% of female and 6.6% of male didn't prefer eating lunch. The most preferred place for lunch was the school dining hall in both gender, and the rate of those who prefer restaurants/cafes was 4.9% for female and 11.8% for male. The rate of those who prefer fast food was only 1% of female and 2.3% of male. While it was the most preferred place for dinner in both gender was dormitory (57.4% of female, 49.6% of male), the rate of those who prefer fast food was 12.9% of female and 36.1% of male. In this study, it was seen that university students have a low level of habit of eating fast food or in restaurant/cafe. It is noteworthy that the rate of meal skipping was low level. The reason for this may be due to their education in the field of health. However,

reducing foods such as bagels and pastries consumed at breakfast, as well as gaining the habit of breakfast will not only balance the energy intake of individuals, but also contribute to their adequate and balanced nutrition. It should be aimed to identify the nutritional problems of the students and to gain correct eating habits instead of the wrong eating preferences.

**Keywords:** eating habits, food preferences, meal consumption

## GİRİŞ

Üniversite öğrencileri erişkin döneme geçme aşamasında olan çocukluk çağı sonrası ilk gruptur. Sağlığın korunmasında önemli bir yere sahip olan beslenmenin, gelişim sürecinin hızlı olduğu gençlik döneminde farklı bir öneme sahiptir (Yazıcı,2003). Gençlerin ilgi alanlarındaki artış, bağımsızlık kazanmaları, kendi kendine karar verme yetkisi, sosyal hayatta değişim ve yaşıtlarıyla bütünleşme kaygıları zamanlarının büyük kısmını dışarıda geçirmeye yönlendirebilmektedir. Bu durum da beslenme alışkanlıkları ve davranışlarının değişmesine, fast-food gıdaların ve atıştırmalıkların aşırı tüketilmesine, yanlış diyet uygulamalarına ve öğün atlamalarına neden olabilmektedir (Kardaş ve Orbak,2002). Bir günde tüketilen öğün sayısı, atlanılan öğün, öğün atlama nedenleri ve öğün aralarında besin tüketim durumları bireyin beslenme alışkanlığını yansıtabilmektedir (Arslan ve ark.,1993).Yapılan bazı çalışmalarda öğrencilerin genellikle öğünlere dikkat etmedikleri, başta kahvaltı olmak üzere öğünleri geçiştirdikleri, sandviç ve simit gibi hazır ve ulaşması kolay yiyecekleri daha çok tükettikleri, ekonomik zorluklar ve öğrencilerin yurt şartlarının kötü olmasından dolayı beslenmelerinin iyi olmadığı ve beslenmeyi karınlarını doyurmakla aynı anlama getirdikleri saptanmıştır (Heşeminia ve ark.,2002; Durmaz ve ark.,2002; Garibağaoğlu ve ark.,2006). Oysa gençlik dönemindeki hızlı büyüme ve gelişme, besin gereksinimlerini arttırmakta, yetersiz ve dengesiz beslenme büyümede duraklamalara yol açmakta, kötü beslenme alışkanlıkları da ileride kalp-damar hastalıkları, diyabet, bazı kanser türleri, gut ve artirit, obezite gibi pek çok hastalığın ortaya çıkışını kolaylaştırmaktadır (Baltacı ve ark.,2008; Demory-Luce ve ark., 2004). Üniversite öğrencilerinin okul çevre ve yurt ortamına uyum çabalarında zorlanma ve ekonomik yetersizliklerin üzerine bilinçsiz ve gereksiz yiyecek içecek tüketme, fast-food beslenme eğilimleri eklenince öğrencilerin beslenmeyle ilişkili sağlık sorunları daha da artmaktadır (Heşeminia ve ark., 2002). Bu çalışma üniversite öğrencilerinde öğün tüketim durumlarının ve öğün tercihlerinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi'nde eğitim gören 306 kadın ve 136 erkek olmak üzere toplam 442 genç yetişkin birey katılmıştır. Bireylerin beslenme alışkanlıklarını değerlendirmek amacıyla ana ve ara öğün sayıları, ana öğünlerde sıklıkla tükettikleri besinler ve öğünlerin tüketildiği yerler sorgulanmıştır. İstatistiksel analizler SPSS (IBM SPSS Statistics 20.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Bulguların yorumlanmasında frekans tabloları kullanılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Üniversite ile birlikte farklılaşan bu yaşam şekli sonucunda değişen beslenme davranışları, üniversite öğrencisinin zihinsel ve fiziksel durumunu ilgilendirdiği gibi okul performansını da dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Bu yüzden üniversite öğrencilerinin sahip oldukları beslenme bilgilerinin ve alışkanlıklarının saptanması ve beslenmeye yönelik dikkat çekici önerilerin geliştirilmesi oldukça önemlidir (Erten, 2006). Öğrencilerin beslenme eğilimlerinin tespiti; erişkin dönemde beslenme alışkanlıklarının düzenlenmesi, yetersiz ve dengesiz beslenmenin neden olabileceği sağlık sorunlarının önlenmesi açısından gereklidir. Bu dönemde beslenme alışkanlıklarında ortaya çıkabilecek değişiklikler, üniversite öğrenimi sonrasına etkileyebilmektedir (Mazıcıoğlu ve Öztürk,2003).

Yeterli ve dengeli beslenebilmek için günlük diyetin 3 eşit öğün halinde tüketilmesi gerektiği ve öğünlerin eşit aralıkta olmamasının metabolizmayı bozabileceği bildirilmektedir (Tai ve ark.,1992). Yapılan bir çalışmada öğrencilerin (n:162) %65.4'ünün günde 3 öğün tükettikleri bildirilmiştir (Aksu ve ark.,2006). Başka bir çalışmada ise, üniversite öğrencilerinin %52.0'si günde 3 öğün, %36.0'sı ise günde 2 öğün tüketmektedirler

(Özpınar,2002). Bireylerin öğün tüketim durumlarının değerlendirilmesi Tablo 1'de verilmiştir. Bu çalışmada öğün atlama durumları incelendiğinde en fazla atlanan öğün kahvaltıdır. Kız öğrencilerin %11.8'i, erkek öğrencilerin ise %16.9'u kahvaltı yapmadığını bildirmiştir.

Üniversite öncesinde öğrencilerin beslenme alışkanlıkları aile yaşamının gerektirdiği şekilde devam ederken, üniversite ile birlikte farklılaşan yaşam şekli öğrencilerin beslenme davranışlarını da değiştirebilmektedir. Üniversite hayatı ile birlikte genellikle ev dışında yemek yeme alışkanlığının arttığı görülmektedir (Özpınar,2002). Daviy ve arkadaşlarının (Daviy ve ark.,2006) yaptığı bir çalışmada; öğrencilerin yaklaşık %76'sının kampüs dışında yemek yediği belirtilmiştir. Öğrencilerin %15'i öğle yemeğini, %9'u akşam yemeğini ya bir restorantta ya da fast-food restoranlarda yediği belirtilmiştir. Sabah ve akşam yemeğinin yenildiği yerin sorgulandığı bir çalışmada da; öğrencilerin sabah kahvaltısını ve akşam yemeğinin en çok gerçekleştirdikleri yerin ev, öğle yemeğini en çok gerçekleştirdikleri yerin ise okul-yurt yemekhanesi olduğu saptanmıştır (Erten, 2006). Bu çalışmada ise, kahvaltı öğününü bireylerin %58.8'i ve akşam öğününü %55.7'si yurtta, öğle öğününü ise bireylerin %81.0'i okul yemekhanesinde tüketmektedir. Kızların %27'si, erkeklerin %48.7'si kahvaltıda simit-poğaça tercih ederken, kızlarda ve erkeklerde en fazla peynir (sırasıyla %84.4 ve %69.9) tercih edilmektedir. Öğle yemeğini kızların %13.4'ü, erkeklerin ise %6.6'sı tüketmemektedir. Her iki cinsiyette de en fazla tercih edilen yer okul yemekhanesi olup, restaurant/cafe gibi işletmeleri tercih edenlerin oranı kızlarda %4.9, erkeklerde ise %11.8 olarak belirlenmiştir. Öğle yemeğinde fast food tercih edenlerin oranı kızlarda %15.1 iken erkeklerde %23.6 olarak belirlenmiştir. Akşam yemeği tüketmeyenlerin oranı ise kızlarda sadece %1, erkeklerde %2.3 olarak bildirilmiştir. Akşam yemeğinde her iki cinsiyette fazla tercih edilen yer yurt iken (kızların %57.4, erkeklerin %49.6), fast food tercih edenlerin oranı kızlarda %12.9, erkeklerde %36.1 olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, bireylerin restaurant/cafe yiyecekleri veya fast-food tüketme alışkanlığı oldukça düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Bireylere kahvaltının önemi hakkında verilecek beslenme eğitimlerinin kahvaltı tüketimine teşvik edeceği düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada bireylerin restaurant/kafe yiyecekleri veya fast-food tüketme alışkanlığı oldukça düşük düzeydedir. Bu sonuca ulaşmada, öğrenim gördükleri sağlık alanındaki bilgi düzeylerinin yüksek olması sebep gösterilebilir. Öğrencilere sağlıklı beslenme alışkanlıklarının kazandırılması için toplu beslenme yapılan okul yemekhanesi ve kantin gibi alanlarda; hijyen, ekonomiklik, damak tadına uygunluk, kolay ulaşılabilir olma gibi koşullar sağlanmalıdır.

**Tablo 1.** Bireylerin öğün tüketim durumlarının değerlendirilmesi

| | Kız (n:306) | | Erkek (n:136) | |
|---|---|---|---|---|
| | **S** | **%** | **S** | **%** |
| Kahvaltı yapıyor musunuz? | | | | |
| **Evet** | 270 | 88.2 | 113 | 83.1 |
| **Hayır** | 36 | 11.8 | 23 | 16.9 |
| Sabah öğününü nerede tüketirsiniz | | | | |
| **Yurt** | 172 | 63.7 | 55 | 48.7 |
| **Ev** | 74 | 27.4 | 34 | 30.1 |
| **Okul kantini** | 20 | 7.4 | 22 | 19.5 |
| **Diğer** | 4 | 1.5 | 2 | 1.8 |
| Kahvaltıda tercih edilen besinler | | | | |
| **Süt** | 40 | 14.8 | 13 | 11.5 |
| **Taze sıkılmış meyve suyu** | 8 | 3.0 | 7 | 6.2 |
| **Peynir** | 228 | 84.4 | 79 | 69.9 |
| **Yumurta** | 160 | 59.3 | 61 | 54.0 |
| **Domates – Salatalık** | 169 | 62.6 | 59 | 52.2 |
| **Zeytin** | 186 | 68.9 | 64 | 56.6 |
| **Reçel-Bal-Pekmez** | 97 | 35.9 | 42 | 37.2 |
| **Tereyağı** | 45 | 16.7 | 23 | 20.4 |
| **Ekmek** | 224 | 83.0 | 73 | 64.6 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Simit-Poğaça** | 73 | 27.0 | 55 | 48.7 |
| **Kek-bisküvi** | 18 | 6.7 | 11 | 9.7 |
| **Çay-Kahve** | 197 | 73.0 | 87 | 77.0 |
| Öğle yemeği tüketiyor musunuz? | | | | |
| **Evet** | 265 | 86.6 | 127 | 93.4 |
| **Hayır** | 41 | 13.4 | 9 | 6.6 |
| Öğle öğününü sıklıkla nerede tüketiyorsunuz? | | | | |
| **Okul yemekhanesi** | 222 | 83.8 | 95 | 74.8 |
| **Okul kantini** | 15 | 5.7 | 4 | 3.1 |
| **Restaurant / cafe** | 13 | 4.9 | 15 | 11.8 |
| **Yurt** | 7 | 2.6 | 6 | 4.7 |
| **Ev** | 8 | 3.0 | 7 | 5.5 |
| Öğle yemeğinde tercih edilen besinler | | | | |
| **Et/sebze yemekleri** | 220 | 83.0 | 110 | 86.6 |
| **Çorba** | 227 | 85.7 | 109 | 85.8 |
| **Pilav / makarna** | 207 | 78.1 | 108 | 85 |
| **Yoğurt /ayran** | 136 | 51.3 | 84 | 66.1 |
| **Salata** | 158 | 59.6 | 82 | 64.6 |
| **Fast-food besinler** | 40 | 15.1 | 30 | 23.6 |
| Akşam yemeği tüketiyor musunuz? | | | | |
| **Evet** | 303 | 99.0 | 133 | 97.7 |
| **Hayır** | 3 | 1.0 | 3 | 2.3 |
| Akşam öğününü sıklıkla nerede tüketiyorsunuz? | | | | |
| **Restaurant / Cafe** | 12 | 4.0 | 24 | 18.0 |
| **Yurt** | 174 | 57.4 | 66 | 49.6 |
| **Ev** | 117 | 38.6 | 43 | 32.3 |
| Akşam yemeğinde tercih edilen besinler | | | | |
| **Et/sebze yemekleri** | 269 | 88.8 | 112 | 84.2 |
| **Çorba** | 241 | 79.5 | 105 | 78.9 |
| **Pilav / makarna** | 232 | 76.6 | 109 | 82.0 |
| **Yoğurt /ayran** | 195 | 64.4 | 91 | 68.4 |
| **Salata** | 217 | 71.6 | 87 | 65.4 |
| **Fast-food besinler** | 39 | 12.9 | 48 | 36.1 |

## SONUÇ

Öğrencilerin okul çevresi, yurt ortamı gibi yeni bir çevreye uyum çabalarında zorlanma ve ekonomik yetersizlikler, bilinçsiz yiyecek içecek tüketme, fast-food tüketiminde artış öğrencilerin beslenme sorunlarıyla beraberinde sağlık sorunlarını da getirmektedir. Yapılan bu çalışmada bireylerin restaurant/cafe yiyecekleri veya fast-food tüketme alışkanlığı oldukça düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Bireylerde öğün atlama oranın da düşük olması dikkat çekmektedir. Bu sonuca ulaşmada, öğrenim gördükleri sağlık alanındaki bilgi düzeylerinin yüksek olması sebep gösterilebilir. Ancak kahvaltıda tüketilen simit-poğaça gibi besinlerin azaltılması, bunun yanı sıra sabah kahvaltı alışkanlığı kazandırılması bireylerin enerji alımını dengelemekle kalmayıp yeterli ve dengeli beslenmesine de katkı sağlayacaktır. Üniversite dönemi boyunca tüm öğünlerin düzenli bir şekilde alınması hem sağlık hem de okul başarısı açısından önemlidir.Öğrencilerin beslenme sorunlarının tespit edilip, yanlış beslenme tercihleri yerine doğru beslenme alışkanlıklarının kazandırılması hedeflenmelidir.

## KAYNAKLAR

Aksu S, Aydın T, Öztürk S, Metinoglu M 2006. Namık Kemal Üniversitesi Yüksekokulu Ögrencilerinin beslenme alıskanlıklarının incelenmesi. I. Ulusal Saglıgı Gelistirme ve Saglık Egitimi Kongresi. Bildiri Kitabı, Mugla, s.111.

Arslan P, Karaağaoğlu N, Duyar Y, Güleç E 1993. Yükseköğrenim gençlerin beslenme alışkanlıklarının puanlandırma yöntemi ile değerlendirilmesi. Beslenme ve Diyet Dergisi, 22:195-208

Baltacı G, Ersoy G, Karaağaoğlu A 2008. Ergenlerde sağlıklı beslenme, hareketli yaşam. Ankara, Sinem Matbaacılık. Available at: https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/t41.pdf [04.04.20]

Daviy SR, Benes BA, Driskell JA 2006. Sex differences in dieting trends, eating habits, and nutrition beliefs of a group of midwestern college students. Journal of the American Dietetic Association, 106:1673-1677.

Demory-Luce D, Morales M, Nicklas T 2004. Changes in food group consumption patterns from childhood to young adulthhood: The bogalusa heart study. Journal of the American Dietetic Association, 104:1684-1691.

Durmaz H, Sağun E, Tarakçı Z 2002. Yüksekokul öğrencilerinin içme sütü tüketim alışkanlıkları. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi,13(1-2):69-73.

Erten M 2006. Adıyaman ilinde eğitim gören üniversite öğrencilerinin beslenme bilgilerinin ve alışkanlıklarının araştırılması. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Garibağaoğlu M, Budak N, Öner N, Sağlam Ö, Nişli K 2006. Üç farklı üniversitede eğitim gören kız öğrencilerin beslenme durumları ve vücut ağırlıklarının değerlendirmesi. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of HealthSciences),15(39):173-180.

Heşeminia T, Çalışkan D, Işık A 2002. Ankara'da yüksek öğretim öğrenci yurtlarında kalan öğrencilerin beslenme sorunları. İbni Sina Tıp Dergisi, 7:155-167.

Kardaş F, Orbak Z 2002. Adolesanda beslenme. Sendrom Aylık Aktüel Tıp Dergisi.Kasım, 90-96

Mazıcıoğlu MM, Öztürk A 2003. Üniversite 3 ve 4. sınıf öğrencilerinde beslenme alışkanlıkları ve bunu etkileyen faktörler, Erciyes Tıp Dergisi, 25(4):172-178.

Özpınar Karayomuk N 2002. Beslenme dersi alan ve almayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Meslek Yüksekokulu öğrencilerinin beslenme bilgi ve alışkanlıkları üzerine bir araştırma. G.Ü. Saglık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Tai MM, Castillo PP, Sunyer FX 1992. Meal size and frequency. Effect on the thermic effect of food. The American Journal of Clinical Nutrition, 54:783.

Yazıcı E 2003. Üniversite Gençliği 2001, Üniversite gençliğinin sosyo-kültürel profili üzerine bir alan araştırması-Gazi örneği. Gazi Üniversitesi Yayını. Ankara.

# Kıyı bölgelerinde atık kirliliğine maruz kalan midyelerde metallerin biyoakümülasyonu ve insan sağlığı üzerindeki etkileri

Çevre Müh. Yasemin KERTİL, Mustafa BİLGE, İbrahim ÖZKOÇ, Hülya Böke ÖZKOÇ

Ondokuz Mayıs, Mühendislik Fak., Çevre Müh. Böl., Samsun, Türkiye

yaseminkertil@gmail.com

## Özet

Dünyanın oluşumundan itibaren su ortamları, kullanılmış sular ve diğer atıklar için bir alıcı ve uzaklaştırıcı ortam olarak kullanılmaktadır. Gelişen endüstrilerin ve daha modern bir yaşam sağlama amacıyla sürdürülen çabaların sonucu olarak ortaya çıkan kirleticiler, her türlü çevre koşullarında ve bulundukları ortamda kalıcı olmaları, ekosistemde meydana getirdikleri etkiler nedeniyle çevre ve insan sağlığını tehdit etmektedir.

Dünyada, artan nüfus ile ihtiyacı karşılayacak besin kaynaklarına gereksinim duyulmaktadır. Deniz canlılarıda bu besin kaynaklarından bir kısmını oluşturmaktadır. Ekolojik olarak çeşitli türleri barındıran deniz suyunda insan tüketimine açık birçok canlı yaşamakta ve midyede tüketimi hızla artan deniz canlılarından biri olarak tüketiciye ulaşmaktadır.

Deniz canlılarından midyeler suyu filtre ederek suda bulunan gıdalarla beslenmekte ve gıdalarla birlikte birçok kirleticiyi de bünyelerine almaktadırlar. Kirleticilerin bir bölümünü oluşturan ağır metaller, metal bileşikleri ve çeşitli mineraller; göller, nehirler, körfez ve okyanuslar ile bunların dip kısımlarına geniş bir şekilde yayılmaktadırlar.

Derişimleri sürekli artan ağır metaller sucul organizmalar tarafından bünyelerine alınmakta ve besin zinciri aracılığıyla tüm canlılara ulaşmaktadırlar. Bazı metaller canlıların yaşamları için gerekli olsalar da cıva, kurşun, kadmiyum, bakır, çinko, krom ve arsenik gibi metallerin denizel ortamda meydana gelebilecek yüksek içerikleri, canlılar için toksik olabilmektedirler. Bu yüzden canlı bünyesinde akut ve kronik rahatsızlıklara yol açabilmektedirler. Ayrıca belirli bir derişimden sonra toksik olarak etki göstermektedirler (Fe, Zn, Cu, Ni ve Se). Yaşamsal olmayan ağır metaller (Hg, Cd ve Pb) ise başlangıç derişimlerinden itibaren toksik etki göstermekte ve çok düşük derişimlerde bile psikolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine neden olabilmektedirler.

Ağır metallerin vücuttaki toksik etkilerinin temel nedeni hücre içi metabolik süreçlerde oluşturdukları bozukluklar olabilmektedir. Söz konusu bozukluklar; DNA hasarı, oksidatif stresin artışına bağlı oksidatif protein yıkımı, organik hastalıklar (böbrek hastalığı, alerji, egzama, astım vb.) ve nörolojik bozuklukları (depresyon, migren, alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı) olarak sayılabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Midye tüketimi, metal, biyoakümülasyon, insan sağlığı riskleri

# Bioaccumulation of metals in mussels exposed to waste pollution in coastal areas and their effects on human health

## Abstract

Since the formation of the world, water environments have been used as a receiving and repelling medium for used water and other wastes. Pollutants that emerge as a result of developing industries and efforts to provide a more modern life threaten the environment and human health due to their effects on the ecosystem, being permanent in all environmental conditions and environments.

In the world, there is a need for nutrient sources to meet the needs with increasing population. Sea creatures also make up some of these food sources. Ecologically, there are many creatures that are open to human consumption in sea water, which contains various species, and it reaches the consumer as one of the sea creatures whose consumption is growing rapidly.

Mussels from sea creatures filter the water and feed on the food in the water and take many pollutants with their food. Heavy metals, metal compounds and various minerals that form part of the pollutants; They spread widely to lakes, rivers, gulf and oceans and their bottoms.

Heavy metals, whose concentrations are constantly increasing, are taken into their bodies by aquatic organisms and reach all living things through the food chain. Although some metals are necessary for the life of living things, high content of metals such as mercury, lead, cadmium, copper, zinc, chromium and arsenic, which may occur in marine environment, can be toxic to living things. Therefore, they can cause acute and chronic diseases in the body. In addition, they show toxic effects after a certain concentration (Fe, Zn, Cu, Ni and Se). Non-vital heavy metals (Hg, Cd and Pb) have a toxic effect from the initial concentrations and can cause health problems by affecting the psychological structure even at very low concentrations.

The main reason of the toxic effects of heavy metals in the body may be the disorders they create in the intracellular metabolic processes. These disorders are; DNA damage can be counted as oxidative protein breakdown due to the increase of oxidative stress, organic diseases (kidney disease, allergy, eczema, asthma, etc.) and neurological disorders (depression, migraine, alzheimer's disease, parkinson's disease).

**Keywords:** Mussel consumption, metal, bioaccumulation, human health risks

## GİRİŞ

Nüfusun artışı, yaşam standartlarının yükselmesi, teknolojik gelişmeler, sanayileşme, kentleşme gibi olguların sonucu çevre kirliliğinin artmasına, yaşam kaynaklarının yani ekosistemin daha fazla kirlenmesine neden olmaktadır. Ekosistemin bir bölümünü oluşturan sucul ortam, kullanılmış sular ve diğer atıklar için bir alıcı ve uzaklaştırıcı bölge olarak kullanıldığında, ekosistem içinde hava ve toprağa oranla en yoğun kirlenmeye uğrayan ortamdır.

Dünyanın hızlı nüfus artışına, büyük bir kısmının kıyısal yerleşimlerde yaşaması ve ihtiyaçları karşılarken meydana gelen atıklarını sucul ortama boşaltmasından kıyı bölgelerinde kirlilik hergeçen gün artmaktadır. Kıyı yönetiminin tek ana amacı, doğal ekolojik işleyişin korunması ve sürdürülmesi olduğunu ve aynı zamanda toplumun faydalarını (ekosistem hizmetlerine ve toplumsal faydalara dayalı olarak) sağlamaktır. Bu da ekosistem yaklaşımının fiili yönüdür.

Kimyasalların atılım hızı organizmaya giriş hızından yavaşsa kimyasal organizmada birikmeye (Biyoakümülasyon) başlamaktadır. Kimyasallar özellikle yağ dokularda birikerek ileride ciddi problemlere yol açabilmektedir.

Solunum, sindirim veya deri absorpsiyonu ile canlı bünyesine giren ve dışarı atılamayarak girdiği ortamda birikerek uzun sürede kronik toksisite ve kanserojen etki gösteren, biyolojik arıtmaya karşı dirençli olan, yeraltı ve yüzeysel suları kirletmemeleri için kesin önlem alınması gereken atıklar tehlikeli ve zararlı atıklardır. Bunlar arasında toksisitenin asıl kaynağının ağır metaller olduğu belirtilmektedir (Şanlı, 1995).

Yapılan bilimsel çalışmalarda ağır metallerin genel olarak;

- suda,
- sedimanda ve
- sucul canlılarda biriktiği gözlenmektedir (Austin ve Munteanu, 1984; Oberholster ve ark., 2010; Radwan ve ark., 1990).

Ağır metaller önemli ölçüde çevre kirlenmesine neden olmakta ve düşük konsantrasyonlarda dahi deniz organizmalarında ve insanlar üzerinde toksik etki göstermektedirler.

İnsanların farklı esansiyel metallere maruz kalmasının ana kaynağı, deniz ürünleri tüketimi ile besin zinciridir ve önerilen günlük iz metal alım seviyelerinin elde edilmesine katkıda bulunabilir. Bu nedenle, ağır metal risklerine maruz kalmanın insan sağlığı üzerindeki etkilerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır.

## DENİZ ÜRÜNLERİNDEN MİDYELER

İnsanların yaşam standardının artışına paralel olarak beslenme rejimini çeşitlendirmeye çalışan tüketiciler, balığın yanında damak zevklerine uygun yumuşakça ve kabuklu ürünlerin tüketimine giderek daha fazla ağırlık vermektedirler. Bunlardan birisi de midyedir (Kaba ve Erkoyuncu. 2005). Biyoindikatör özelliklerinin yanı sıra midyeler içerdikleri makro ve mikro besin elementleri bakımından son yıllarda artan beslenme bilincinin ihtiyaç duyduğu bileşenleri karşılayabilecek yapıdadır.

Midyeler, çok sayıda diğer türe gıda ve yaşam alanı gibi temel ekolojik ortamlar sağladığından ekolojik olarak önemlidir. Midyeler yumuşakçalar şubesine ait çift kabuklu sucul canlılardır. Tamamı tatlı su ya da denizlerde yaşayan 30.000 tür bulunmaktadır. Şekil 1 'de de bu türler arasında olan kum midyesi, kara midye, kıllı midye, istiridye ve kidonya örnek olarak görülmektedir.



**Şekil 1.** Midye türlerinden bazıları (kum midyesi, kidonya, istiridye, kıllı midye ve kara midye)

Bivalvia sınıfından ve Mytilidae familyasına ait midyeler ılıman denizlerde istilacı olarak yayılır ve ülkemizde Doğu Akdeniz kıyıları hariç tüm kıyılarda görülür.

Birincil tüketiciler olarak, antropojenik kirleticilerin abiyotik fazdan ve birincil üretim seviyesinden daha yüksek seviyelere transferinde katalizör olarak hareket ederler. Midyeler bakteriyel analizlerde biyolojik indikatör olarak kullanılmaktadırlar (Guillon-Cottard vd., 1998).

Midyeler, fitoplankton ve 2-100 µ boyutlarındaki organik ve inorganik her türlü partikülü süzerek beslenirler. Besinleri süzerek aldıkları için suyun içerisindeki patojen mikroorganizmaları, biyotoksin ve kimyasal kontaminantları da bünyelerine alarak biriktirmekte ve bu nedenle de kirliliği bünyelerinde barındırarak insan tüketiminde tehlike oluşturabilmektedirler. Mikrobiyolojik kontaminantların insan vücudunda etkileri kısa süreçte ortaya çıkmaktadır (Çolakoğlu F.A. ve Çolakoğlu S., 2014). Ortalama 7-8 cm boyutlarındaki bir midye saatte 10-15 L suyu süzebilmektedirler. Midyelerin filtrasyon hızında; midye boyutu, partikül boyutu, partikül yoğunluğu, partikül türü, su sıcaklığı ve su akıntısı etkilidir.

Midye mükemmel bir demir, çinko, iyot, kalsiyum, bakır, manganez ve potasyum kaynağıdır ve bu nedenle insan sağlığı için faydalı olabilmektedirler. Ancak, midye de kontamine olabilir ve hastalıkları teşvik ederek zehirlenmelere neden olabilmektedirler. Midyenin besin varlığını değerlendirmek ve potansiyel olumsuz sağlık etkilerini en aza indirmek için midye içindeki elementlerin içeriğinin bilinmesi gerekmektedir.

Kimyasal elementlerin birçoğu midyelerin vücut kompozisyonlarını oluşturur ve midyenin normal yaşamsal işlevi için gereklidirler. Hayvan gövdesinde ana mineraller 100 mg/g' dan fazla iken mikro mineraller ve esansiyel olmayan elementler daha düşük miktarlarda bulunurlar. Farklı ağır metal iyonlarının farklı toksik istila mekanizmaları vardır.

Bazı metaller(Cu, Zn, Fe, Ca vb.) yaşamın sürdürülebilmesi için vazgeçilmez iken bazıları(Pb, Hg, Cr, Ni, Cd vb.) da ileri derecede toksiktirler. Ancak vazgeçilmez görünen metallerin de belirli miktarlardan sonra toksik etkili olabilmektedir.

Örneğin; bakır, saç, deri ve kemik gibi bazı organların temel bilişimi arasında bulunmaktadır. Bakır elementinin eksikliği ise çocukluktan itibaren önemli sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Bununla birlikte

kurşunun düşük oranda alınması bile insanlar için toksik etki yaratma potansiyeline sahiptir **(**Dökmeci İ ve Dökmeci AH, 2005; Sienko, 1983**).**

Bazı ağır metaller sucul organizmalara direkt toksik olan çoğu deniz ve nehir organizması tarafından önemli seviyelerde birikirler. Canlı vücudunda biriken ağır metal, limiti aşmadığı sürece genellikle toksik değildir. Çünkü bazı metaller ancak en yüksek derişimlere eriştiklerinde birikmeye başlarlar. Bu birikim, hem sahil ortamındaki canlılar üzerinde metallerin muhtemel zararlı etkileri, hem de insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri açısından fikir verir.

Farrington ve ark.(1983), kıyı kirliliği izlemek için bivalflerin ideal bir izleme aracı olduğunu gösteren uygunluk kriterleri;

- Yerleşik düzene sahip
- Geniş coğrafik dağılım
- Metal ile kirlenmiş su ortamına toleranslı
- Sert olduklarından kültürü içinde tutarlar
- Tuzluluk, sıcaklık gibi fiziksel değişimlere dirençli
- Uzun yaşam süreleri
- Bazı kirliliklere duyarlı
- İz metal kirliliğinin çabuk belirlenmesi
- Numune alımı ve laboratuvarda kirlilik analizinin oldukça kolay olması midyelerin biyoindikatör canlı olarak kullanılmasında önemli izlenimlerdendir.

İhtiva ettiği çoklu doymamış yağ asitleri bakımından başta koroner hastalıklar olmak üzere mental gelişimde dahil olmak üzere birçok sağlık sorununun giderilmesinde ihtiyaç duyulan n-3 yağ asitlerini ihtiva etmektedir.

Yapılan bazı araştırmalara göre genellikle en yüksek birikim karaciğerde, en düşük birikim ise kas dokusunda gözlenmektedir. Bu birikim de hücresel ve moleküler düzeyde işlevsel ve yapısal bozukluklara sebep olmaktadır. Solunum, beslenme ve deri yoluyla insan vücuduna girerek dokularda birikerek etki gösterirler. Vücuttan uzaklaştırılmaz ise zaman içinde insan sağlığını tehdit eden toksik değere ulaşırlar(Güner, 2008).

**Şekil 2.** Bazı metallerin insan sağlığı üzerindeki etkileri



## SONUÇ

Kontamine kabuklu su ürünlerinin tüketilmesi ile ortaya çıkan semptomlar toksinin varlığı ve konsantrasyonuna bağlı olarak tüketicilerde ciddi bazende ölümcül zehirlenmelere neden olmaktadırlar.

Kabuklu su ürünlerinden kaynaklanan gıda zehirlenmelerini önlemek için zehirlenmeye neden olan planktonların;

- türleri,
- gelişme şartları ve
- dağılımları hakkında bilgi sağlanmalıdır.

Kabuklu su ürünleri temiz sulardan temin edilmeli ve düzenli olarak toksin yönünden incelenmelidirler.

Kıyısal ekosistemin incelenmesi ve ciddi değişimlerin gözlenmesi bizlere kirlilik konusunda daha dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir.

Yüksek seviye midye tüketicileri için potansiyel sağlık risklerini en aza indirmek için midye tüketim miktarlarının sınırlı olması gerektiği konusunda uyarılmalıdırlar.

Üçüncül tüketici olan insanın tüketimi amacıyla toplanan midyelerin kirlilik olasılığının az olduğu konumlardan toplanmasıyla risk azaltılabilir.

Kirliliği engellemek için şüphesiz alınması gereken önlemlerin başında, çevre bilincinin oluşturulması ile birlikte sanayi ve evsel arıtmaların ciddi bir şekilde denetlenmesi, gereksiz gübreleme ve tarım ilaçlarından sakınma ve alternatif ucuz arıtma sistemlerinin geliştirilmesi yer almalıdır.

## KAYNAKLAR


- Anonim. Toxicity, Seafood, http://www.emedicine. com, 10.03.2007.
- Austin, A., Munteanu, N., (1984). Evaluation of changes in a large oligotrophic wilderness park lake exposed to mine tailing effluent for 14 years: The phytoplankton. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, 33(1) 39-62.
- Bat L, Gündoğdu A, Öztürk M, Öztürk M, (1999). Copper, zinc, lead and cadmium concentrations in the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis (L. 1718) from the Sinop coast of the Black Sea. Turk J Zool 23, 321-326.
- Çolakoğlu, F.A., & Çolakoğlu, S. (2014). Türkiye' de çift kabuklu yumuşakça sektöründe uygulanan prosedürler ve durum analizi. Gıda Dergisi, 78-87.
- Dökmeci İ, Dökmeci AH, (2005). Toksikoloji Zehirlendirmede Tanı ve Tedavi, 4.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Egemen Ö, (2000). Çevre ve Su Kirliliği. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 42, Bornova-İzmir.
- Farrington, J.W., Goldberg, E.D., Risebrough, R.W., Martin, J.H., Bowen, V.T., (1983). U.S. Mussel Watch 1976–1978: an overview of the trace-metal, DDT, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. Environ. Sci. Technol. 17, 490–496.
- Francesconi KA, Edmonds JS, (1998). Arsenic species in marine samples. Croa Chem Acta 71, 2, 343-359.
- Guillon-Cottard, I., Augier, H., Console, J.J., & Esmieu, O., (1998). Study of microbiological pollution of a preasure boat harbour using mussels as bioindicators. Marine Environmental Research, 45 (3), 239-247.

- Güner, U., (2008).: "Carassius carassius _da Bakır-Kadmiyum EtkileŞiminin Karaciğer Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi‖ , Journal of Fisheries Sciences.com , 2(1) 5465.
- Grimmelt B, Nijjar MS, Brown J MacNair N, Wagner S, Johnson GR, and Ahmend JF., (1990). Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (Mytilus edulis) and toxicity in mice. Toxicon; 28: 501- 8.
- Hammand, P. B. and Beliles, R. P., (1980). Metals. In: J. Doull, C. D. Klaassen and M. O. Amdur ed. Toxicology 2th Ed. McMillan Publishing Co. Inc. New York; pp: 409-462.
- Julshamn K, Grahl-Nielsen O, (1996). Distribution of trace elemets from industrials discharges in the Hardangerfjord, Norway. A multivariate data-analysis of saithe, flounder, and blue mussel as sentinel organisms. Marine Pollution Bulletin 32, 564-571.
- Kaba, N., & Erkoyuncu, İ., (2005). Çeşitli şekillerde işlenen midyelerin (Mytilus galloprovincialis Lamarck, 1819) donmuş depolanması sırasında duyusal ve kimyasal kalitelerinin belirlenmesi. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 36 (2), 193-200.
- Kaya, S., Pirinçci, İ. ve Bilgili, A., (1998). Çevre Bilimi ve Çevre Toksikolojisi. Medisan Yayın Serisi, Yayın No:36.
- Kurt P. and Ozkoc Boke H., (2004). A Survey To Determine Levels Of Chlorinated Pesticides And PCB's In Mussels And Seawater From The Mid Black Sea Coast of Turkey, Marine Pollution Bulletin 48, 1076-1083. (**S**CI) DOİ=10.1016/j.marpol bul.2003.12.013.
- Oberholster, P.J., Myburgh, J.G., Ashton, P.J., Botha, A.M., (2010). Responses of phytoplankton upon exposure to a mixture of acid mine drainage and high levels of nutrient pollution in Lake Loskop, South Africa. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73(3), 326-335.
- Radwan, S., Kowalik, W., Kowalczyk, C., (1990). Occurrence of heavy metals in water, phytoplankton and zooplankton of a mesotrophic lake in eastern Poland. Science of The Total Environment, 96(1-2), 115-120.
- Shimizu Y., (1984). Paralytic shellfish poisoning. Forthscritte Der ChemieOrganischerNaturstoffe; 45: 235- 64.
- Sienko, R.A. (1983). Temel Kimya (Chemistry:Principles and Properties), (Çevirenler: Gündüz N., Gündüz T., Tüzün C., Pulat E., Üneri S., Zeren A., Özgüner S.), Savaş Yayınları,Fen Bilimleri Dizisi.
- Selinus O, Alloway B, Centeno JA, Finkelman RB, Fuge R, Lindh U, Smedley P(Editors), (2005). Essentials of Medical Geology, Impacts of Natural Environment on Publice Health, Elsevier Academic Pres.
- Şanlı Y., (1995). Metaller ve Diğer İnorganik Maddeler. Alınmıştır: S.Kaya Ed. Veteriner Klinik Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi, Yayın No:21. Ankara.

# 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion' un sentezi ve gizli parmak izlerinin tespitinde kullanımı

Kıymet BERKİL AKAR[1*], Oğuzhan BEBEK[1]

[1]Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Tokat, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: kiymet.berkilakar@gop.edu.tr

**Özet**

Doğal bir boya olan lawson, bir 2-sübstitüe-l,4-naftokinon türevidir. Lawson'un gizli parmak izlerini geliştirme potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Lawson, parmak izi sıvısındaki amino asitlerle reaksiyona girerek fotolüminesans özellik gösteren parmak izleri oluşturur. Bu çalışmada, 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo) naftalin-1,4-dion bileşiği, 2,5,8-tribromo-1,4-naftokinon'un 4-klorotiyofenol ile nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonu ile sentezlendi ve bileşiğin yapısı spektroskopik teknikler ($^{1}$H-NMR, $^{13}$C NMR, FT-IR ve HPLC/MS) kullanılarak aydınlatıldı. Daha sonra, sentezlenen bileşiğin seçilen kağıt yüzeylerindeki (fotokopi kağıdı ve termal kağıt) parmak izlerini geliştirme yetenekleri incelendi. Bileşik, fotolüminesans özellikte parmak izleri vermek üzere kağıt yüzeyleri üzerindeki gizli parmak izleri ile reaksiyona girdi. Elde edilen sonuçlar, aynı koşullar altında lawson ve yaygın olarak kullanılan ninhidrin ile elde edilenlerle karşılaştırıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Adli bilimler, gizli parmak izi, amino asit, naftakinon

## Synthesis of 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion and its use in detection of latent fingerprint

**Abstract**

Lawsone, a natural dye, is a 2-substituted-1,4-naphthoquinone derivative. Lawsone has been identified as having the potential to enhance latent fingerprints. Lawsone reacts with amino acids in fingerprint secretions and forms photoluminescence impressions. In this study, 5,8-dibromo-2-((4-chlorophenyl)thio)naphthalene-1,4-dione was synthesized by using the nucleophilic substitution reaction of 2,5,8-tribromo-1,4-naphthoquinone and 4-chlorothiophenol, and characterized using spectroscopic techniques ($^{1}$H-NMR, $^{13}$C NMR, FT-IR and HPLC/MS). Then, the ability of the synthesized compound to enhance fingerprints was investigated on the selected paper surfaces (copy paper and thermal paper). The compound reacted with latent fingerprints on the paper surfaces to yield photoluminescence impressions. The results were compared with those obtained with lawsone and widely used ninhydrin under the same conditions.

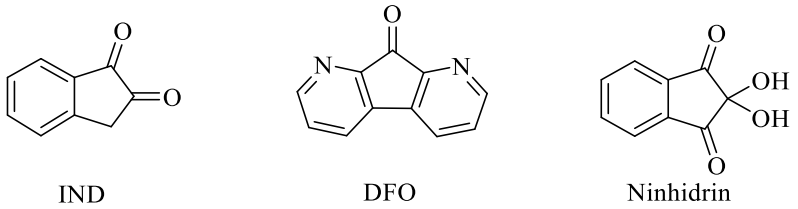
**Keywords:** Forensic sciences, latent fingerprint, amino acid, naphthoquinone

## GİRİŞ

Olay yeri soruşturmalarında failin ya da mağdurun belirlenmesi için bulunabilecek en önemli ve güvenilir delillerden biri parmak izleridir (Sapse ve Petraco, 2007). Parmak izleri 100 yılı aşkın bir süredir adli bilimler ve cezai soruşturmalar için önemli bir kişisel kimlik belirleme yöntemi olmuştur. Suç mahallinde bırakılan parmak izleri genellikle, parmak izi desenlerinin amino asitler, proteinler, polipeptitler ve tuzlar vb. maddelerle bir yüzeye aktarılmasıyla oluşmaktadır (Taylor ve ark., 2012; Drochioiu ve ark., 2013).

Parmak izleri gözeneksiz, yarı gözenekli ve gözenekli gibi üç farklı yüzeyde bulunabilmektedir. Bu yüzeylerden parmak izi tespitinin en zor olduğu yüzeyler gözenekli yüzeylerdir. Gözenekli yüzeyler ahşap, karton, para, gazete kağıdı, temal kağıt, fotokobi kağıdı vb. selüloz türevli yüzeylerdir. Gözenekli yüzeylerdeki izler gizli parmak izleri olarak adlandırılır. Bu izler gözle görülmezler ve tespiti için optik, fiziksel veya

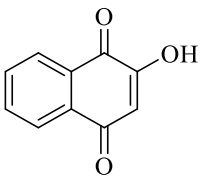
kimyasal tekniklerin uygulanması gerekmektedir (Choi ve ark., 2008). Gizli parmak izlerinin tespiti zordur. Gizli parmak izlerinin tespiti için özel reaktifler ile kimyasal tekniklerin ve ileri optik görüntüleme tekniklerinin kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan reaktifler sınırlı sayıdadır ve üzerlerinde hala pek çok çalışma yapılmaktadır. Parmak izi tespitinde halihazırda sıklıkla kullanılan reaktifler 1,2-indandion (IND), 1,8-diazofluoren-9-on (DFO) ve ninhidrin' dir (Şema 1).




**Şema 1.** Gözenekli yüzeylerdeki gizli parmak izlerinin tespitinde sıklıkla kullanılan reaktifler

Gözenekli yüzeylerdeki gizli parmak izlerinin belirlenmesi çoğunlukla cilt salgısında doğal olarak bulunan aminoasitlerin tespiti esasına dayanmaktadır. Kağıt gibi gözenekli yüzeylerde amino asitlerin birikerek parmak izi desenlerini oluşturduğu ve aşırı nem olmadığı durumlarda selüloza sıkıca tutunduğu bilinmektedir. Ayrıca parmak izleri yoğun neme maruz kalmadıkları sürece ve kağıt ıslak değilse 40 yıl boyunca korunabilmektedir (Jelly ve ark., 2009).

Son zamanlarda araştırmacılar *Lawsonia inermis* bitkisinden izole edilen doğal bir naftakinon türevi olan lawson'un (Şema 2) amino asitlerle reaksiyona girerek güçlü floresans özelliğe sahip ürünler oluşturduğunu, böylece gözenekli yüzeylerdeki gizli parmak izlerini belirleme potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir (Thomas ve Farrugia 2013).




**Şema 2.** Lawson'un kimyasal yapısı

Gözenekli yüzeylerdeki gizli parmak izlerinin tespitinde 1,4-naftakinon türevi birkaç bileşiğin parmak izi reaktifi olarak kullanım potansiyelinin olduğu bildirilmiştir (Jelly ve ark., 2008; 2009; 2010). Eran (2018) tarafından yapılan çalışmada sentezlenen bileşiklerin beyaz fotokopi kağıdı, mavi fotokopi kağıdı, termal fatura kağıdı ve gazete kağıdında parmak izi reaktifi olarak kullanımları incelenmiştir. Bu çalışmada kükürt atomu içeren bileşiklerin parmak izi reaktifi olarak kullanımlarında umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Eran, 2018). Bu nedenle bu çalışmada kükürt ve klor atomlarını ve aynı zamanda ilave bir konjuge benzen halkası içeren 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion' un eldesi ve parmak izi tespitinde kullanılabilme potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion'un Sentezi

4-Klorotiyofenol' ün (120.8 mg, 0.83 mmol) diklormetan (20 mL) içerisindeki çözeltisine 3 eşdeğer mol TEA (230 mg, 2.28 mmol) ilave edilerek 45 dakika boyunca oda sıcaklığında (25 $^{o}$C) manyetik olarak karıştırıldı. Bu sürenin sonunda bu karışıma 2,5,8-tribromo-1,4-naftakinon' un (0.3 g, 0.76 mmol) diklormetan (10 mL) içerisindeki çözeltisi 5 dakikada damla damla ilave edildi ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığında (25 $^{o}$C) manyetik olarak karıştırılmaya bırakıldı. Reaksiyonun ilerleyişi İTK ile takip edildi. Reaksiyon tamamlandığında (15 dk) reaksiyon karışımına su (50 mL) ilave edildi ve diklormetan (3x50 mL) ile ekstrakte edildi. Organik fazlar birleştirilerek su ile (100 mL) yıkandı. Organik faz $Na_2SO_4$ üzerinden kurutuldu, süzüldü ve çözücü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün (375 mg)' den kristallendirme ile 93 mg ürün saf ayrıldı. Kalan kısım küçük $SiO_2$ kolonundan sırasıyla %5, %10, %50' lik etil asetat-hekzan karışımı ile

süzüldü, kristallendirildi ve 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion (339 mg, %98 verim) saf olarak elde edildi.

***5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion:*** Turuncu iğne kristaller, E.N: 195-197 °C, $R_f$= 0.35 (etil asetat-hekzan 1:9); $^1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$); δ 7.78 (AB sistemi, 2H, $H_6$ ve $H_7$), δ 7.51 (AB sistemi, 4H, ArH), δ 6.11 (s, 1H, $H_3$); $^{13}$C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 180.0, 179.3, 155.7, 141.1, 140.1, 137.4, 137.0 (2C), 131.9, 131.5, 130.8 (2C), 128.3, 125.6, 122.4, 121.8; IR ($\nu_{max}$, $cm^{-1}$); 3078, 3046, 1666, 1639, 1590, 1541, 1473, 1427, 1361, 1299, 1255, 1210, 1066, 1008, 873, 833, 823, 644, 535, 518, 503, 454, 418; HPLC/MS m/z 459.9 $[M]^+$.

## Parmak İzi Testleri

### *Parmak izlerinin toplanması*

Parmak izleri, 2 erkek ve 1 kadın olmak üzere toplam donörden doğal şartlarda ve literatürde (Marriott ve ark., 2014) var olan örnek setlerine benzer şekilde toplanmıştır. Her bir parmak izi seti oluşturulurken setler arasında parmak izi salgılarının yeniden üretilip eski haline gelmesi için en az 30 dakika beklenmiştir. Referans maddeler ile karşılaştırma çalışmaları için kullanılacak parmak izi setleri sol taraf referans maddelerimiz ile, sağ taraf ise 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion ile muamele edilmek üzere kullanılmadan önce ortadan ikiye kesilmiştir.

### *Test çözeltilerinin hazırlanması*

5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion Çözeltisi

5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion (30 mg) etil asetat (40 mL) içerisinde çözüldü ve üzerine yavaş bir şekilde HFE 7100 (60 mL) eklenerek seyreltildi.

Lawson Çözeltisi

Lawson (50 mg) bileşiği etil asetat (10 mL) içerisinde çözüldü ve üzerine HFE 7100 (40 mL) eklenerek seyreltildi (Jelly ve ark., 2008).

Ninhidrin Çözeltisi

Ninhidrin (25 g)' in etanol (225 mL) içindeki çözeltisine etil asetat (10 mL) ilave edilerek karıştırıldı. Üzerine asetik asit (25 mL) ilave edilerek stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden 52 mL alınarak 940 mL HFE 7100 ile seyreltilerek kullanıldı (EGM, 2005).

### *Parmak izlerinin reaktiflerle muamele edilmesi*

5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion ve Lawson ile Muamele

Parmak izleri 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion veya lawson çözeltisine 1 dakika süreyle daldırıldı ve oda şartlarında kurumaları sağlandı. Daha sonra izler renk ve lüminesansın gelişmesi için etüvde 150 ºC' de 1 saat süreyle ısıtıldı.

Ninhidrin ile Muamele

Parmak izleri ninhidrin çözeltisine 1 dakika süre ile daldırıldı ve nemlendirilmiş bir etüvde 80 ºC'de 1 saat süreyle ısıtıldı.

### *Gelişen parmak izlerinin fotoğraflanması*

Parmak izleri Nikon D3300 fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı. Fotolüminesans çekimler parmak izleri adli ışık kaynağı (Handscope Xenon FLS 5000) ile ışınlandırılırken (440 nm) kırmızı filtre kullanılarak

gerçekleştirildi. Elde edilen parmak izleri bilgisayar ortamına aktarıldı ve Adobe Photoshop CS6 programı kullanılarak kontrast ve parlaklık ayarları yapıldı.

### *Parmak izlerinin değerlendirilmesi*

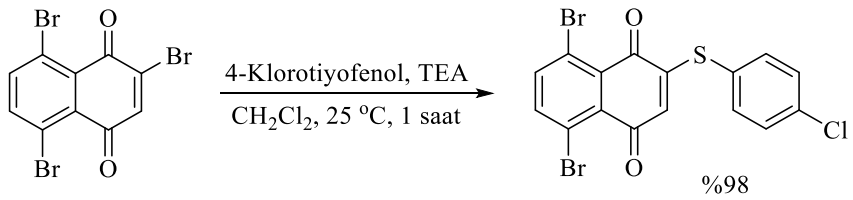
Görünür hale getirilen parmak izlerinin değerlendirilmesinde ve referans maddeleri ile karşılaştırılmasında Bandey skalası (Tablo 1) kullanılmıştır.

*Tablo 1. Bandey skalası (Bandey, 2004).*

| Puan | Detay düzeyi |
|---|---|
| **0** | Hiçbir gelişme yok |
| **1** | Devam etmeyen papil hatları; Tümü kesintili veya noktalar şeklinde |
| **2** | Devamlı papil hatları izin ancak 1/3' ini oluşturuyor; geriye kalan kısım görünmüyor veya noktalar şeklinde |
| **3** | Devamlı papil hatları izin 2/3' ini oluşturuyor; geriye kalan kısım görünmüyor veya noktalar şeklinde |
| **4** | Tam gelişme: İzdeki bütün papil hatları görülüyor |

## BULGULAR ve TARTIŞMA

5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion'un sentezinde 4-klorotiyofenol nükleofili ile yerdeğiştirme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 2,5,8-Tribromo-1,4-naftakinon bileşiğinin TEA bazı varlığında 4-klorotiyofenol ile gerçekleştirilen reaksiyonu sonucunda 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiği %98 verimle elde edilmiştir (Şema 3).

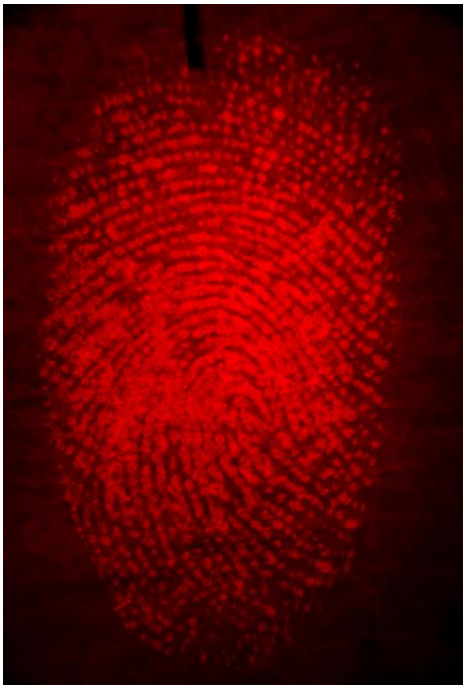
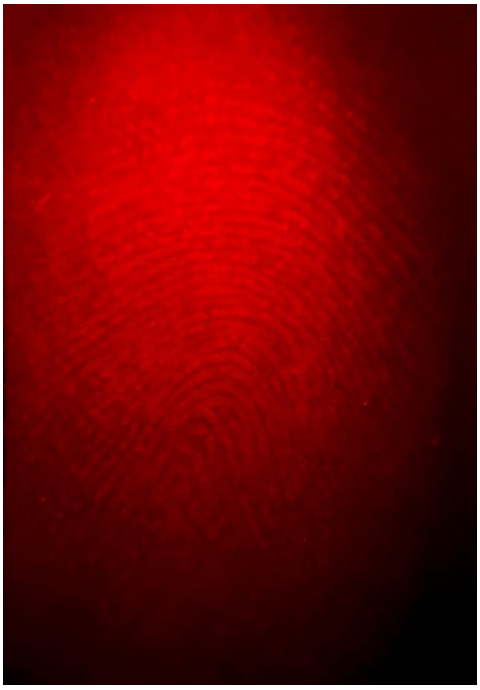



**Şema 3.** 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiğinin sentezi

Bileşiğin yapısı $^{1}H$ ve $^{13}C$ NMR, IR ve kütle spektroskopileri kullanılarak aydınlatılmıştır. 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiğine ait $^{1}H$ NMR spektrumu incelendiğinde naftakinon çekirdeğindeki $H_6$ ve $H_7$ protonlarına ait sinyaller δ 7.78' de bir AB sistemi vermiştir. Fakat etkileşme sabitinin çok küçük olması sebebiyle AB sistemi dublet görünümündedir. $H_3$ Protonuna ait singlet δ 6.11' de görülmektedir. Fenil halkasındaki protonlar da beklendiği gibi bir AB sistemi vermiştir. Etkileşme sabiti çok küçük olduğundan bu sistem de dublet görünümündedir. AB sistemi δ 7.51' de rezonans olmuştur. Bileşiğe ait $^{13}C$ NMR spektrumu yapıyı doğrulamaktadır. Yapıya ait sinyaller sırasıyla δ 180.0, 179.3, 155.7, 141.1, 140.1, 137.4, 137.0 (2C), 131.9, 131.5, 130.8 (2C), 128.3, 125.6, 122.4 ve 121.8' de görülmektedir. IR ve Kütle spektrumları da yapıyı doğrulamaktadır.

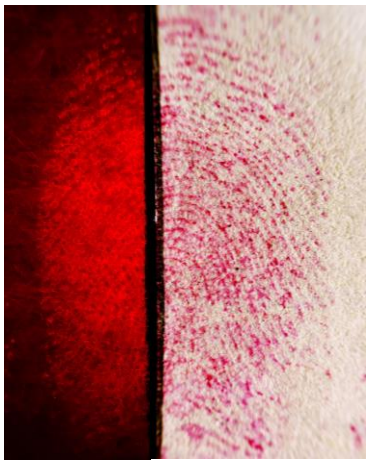
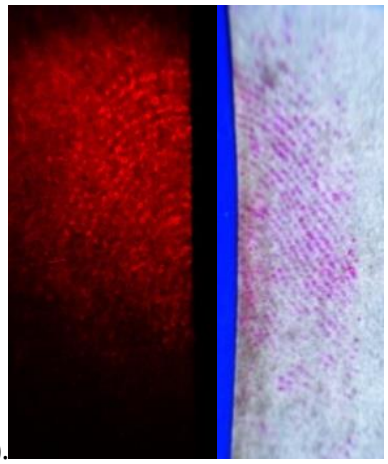
5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiği saf olarak elde edildikten sonra bileşiğin parmak izi testleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle beyaz ve termal kağıt üzerindeki parmak izleri 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion ile muamele edilerek her iki yüzeyde de parmak izlerini görünür hale getirip getirmediği incelenmiştir. Yapılan testler sonucunda 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiğinin parmak izi sıvısındaki amino asitlerle reaksiyona girdiği ve her iki kağıt türünde de parmak izlerini görünür hale getirdiği tespit edilmiştir. Geliştirilen parmak izleri 440 nm'deki ışık altında kırmızı filtre ile görüntülendiğinde kuvvetli fotolüminesans özellik göstermiştir (Şekil 1). Özellikle fotokopi kağıdı üzerindeki parmak izleri yüksek kontrasta sahiptir ve papil hatlarının tamamı görünür hale getirilebilmiştir (Bandey skalası değeri: 4). Termal kağıtta ise parmak izlerinin kontrastı fotokopi kağıdına göre daha düşüktür fakat

yine papil hatlarının tamamı görünür hale getirilebilmiştir (Bandey skalası değeri: 3). Özellikle termal kağıtta en çok karşılaşılan arka plan kararmasının meydana gelmemesi önemli bir avantajdır.

(a).  (b). 

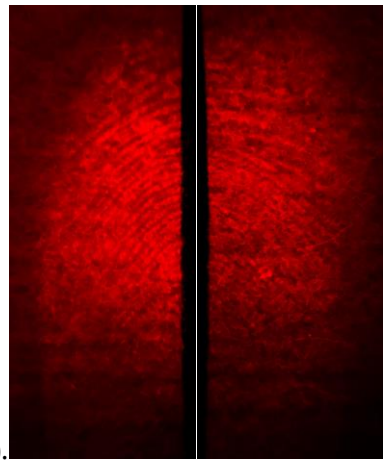
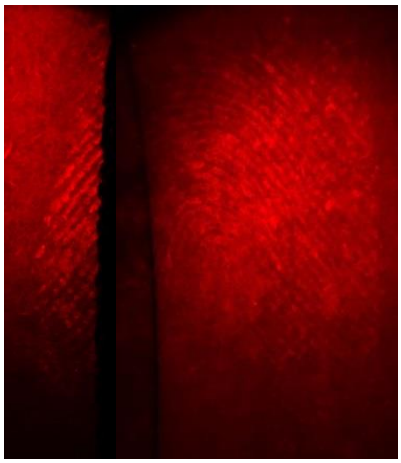
**Şekil 1.** 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion ile geliştirilen (a) fotokopi kağıdı üzerindeki ve (b) termal kağıt üzerindeki parmak izlerinin 440 nm ışık altındaki görünümü

Çalışmada ayrıca aynı şartlar altında oluşturulan parmak izleri 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiği ve karşılaştırma reaktifleri olarak seçilen lawson veya ninhidrin bileşikleri ile ayrı ayrı geliştirilerek elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiği ile elde edilen sonuçlar ninhidrin ile elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında, 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion'un fotokopi kağıdında neredeyse ninhidrin ile aynı ölçüde parmak izini görünür hale getirdiği söylenebilir ve her iki bileşik ile de geliştirilen parmak izlerine Bandey Skalasına göre 3 değeri verilebilir (Şekil 2). Termal kağıtta ise 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion'a kıyasla ninhidrinin daha başarılı olduğu söylenebilir (Bandey skalası değeri sırasıyla 2 ve 3).

(a).  (b). 

**Şekil 2.** 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion (solda, 440 nm ışık altında) ve ninhidrin (sağda, beyaz ışık altında) çözeltileri ile muamele edilen (a) fotokopi kağıdı ve (b) termal kağıt üzerindeki parmak izlerinin görünümü

5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion ile geliştirilen parmak izleri lawson ile geliştirilen parmak izleri ile kıyaslandığında ise her iki kağıt türünde de 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion ile geliştirilen parmak izlerinin daha kuvvetli fotolüminesans özellik gösterdiği görülmektedir (Şekil 3). Bandey skalasına göre incelendiğinde, 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion ve lawson ile görünür hale getirilen parmak izlerine her iki kağıt türü için sırasıyla 3 ve 2 değeri verilebilir.

(a).  (b). 

**Şekil 3.** 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion (solda) ve lawson (sağda) çözeltileri ile muamele edilen (a) fotokopi kağıdı ve (b) termal kağıt üzerindeki parmak izlerinin 440 nm ışık altındaki görünümü

## SONUÇ

Bu çalışmada, yeni bir naftakinon türevi olan 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiğinin sentezi gerçekleştirilmiş ve bu bileşiğin seçilen gözenekli yüzeyler üzerindeki parmak izlerinin geliştirilmesinde parmak izi reaktifi olarak kullanılabilirliğine ilişkin yapılan bir ön çalışma sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar, 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiğinin fotokopi kağıdı ve termal kağıt üzerindeki parmak izlerini başarılı bir şekilde görünür hale getirdiğini göstermiştir. Özellikle fotokopi kağıdında yüksek fotolüminesans özellik gösteren ve yüksek kontrasta sahip parmak izleri elde edilmiştir. Ninhidrin ve lawson ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen parmak izi testleri sonuçları incelendiğinde ise 5,8-dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion bileşiğinin parmak izi reaktifi olarak kullanılabilme potansiyelinin oldukça yüksek olduğu söylenebilir. 5,8-Dibromo-2-((4-klorofenil)tiyo)naftalin-1,4-dion ile parmak izi geliştirme şartlarının optimizasyonu için daha kapsamlı çalışmalara gerek vardır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK (Proje no: 115Z880) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

Bandey, H. L., 2004. Fingerprint development and imaging newsletter: the powders process, study 1. Sandridge: Police Scientific Development Branch, Home Office.

Choi, M. J., McDonagh, A. M., Maynard, P., ve Roux, C., 2008. Metal-containing nanoparticles and nano-structured particles in fingermark detection. Forensic Science International, 179 (2-3), 87-97.

Drochioiu, G., Sandu I., Olteanu, G.I., ve Mangalagıu, I., 2013. Ninhydrin-based forensic investigations 1. fingerprints, International Journal of Criminal Investigation, 1, 37-58.

EGM, 2005. Parmak İzi Geliştirme Teknikleri Temel Eğitim Kitabı , Ankara: EGM.KPL.Dairesi Başkanlığı, Yayın No:6

Eran, B., 2018. Gözenekli yüzeylerdeki gizli parmak izlerinin tespiti için potansiyel parmak izi reaktifleri olarak yeni sübstitüe-1,4-naftakinonlar ve sübstitüe-1,4-antrakinonların sentezi (Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat).

Jelly, R., Lewis, S.W., Lennard, C., Lim, K.F. ve Almog, J., 2008. Lawsone: A Novel Reagent for the Detection of Latent Fingermarks on Paper Surfaces, Chemical Communications, 2008, 30, 3513-3515.

Jelly, R., Lewis, S.W., Lennard, C., Lim, K.F., ve Almog J., 2010. Substituted naphthoquinones as novel amino acid sensitive reagents for the detection of latent fingermarks on paper surfaces, Talanta, 82, 1717-24.

Jelly, R., Patton, E. L., Lennard, C., Lewis, S. W., ve Lim, K. F., 2009. The detection of latent fingermarks on porous surfaces using amino acid sensitive reagents: a review. Analytica Chimica Acta, 652(1-2), 128-142.

Jelly, R., Patton, E. L., Lennard, C., Lewis, S. W., ve Lim, K. F., 2009. The detection of latent fingermarks on porous surfaces using amino acid sensitive reagents: a review. Analytica Chimica Acta, 652(1-2), 128-142.

Marriott, C., Lee, R., Wilkes, Z., Comber, B., Spindler, X., Roux, C., ve Lennard, C., 2014. Evaluation of fingermark detection sequences on paper substrates. Forensic science international, 236, 30-37.

Sapse, D., ve Petraco, N.D.K., 2007. mA step on the path in the discovery of new latent fingerprint development reagents: substituted Ruhemann's purples and implications for the law, 13, 943-948.

Taylor, M. K., Kaye, D. H., Busey, T., Gische, M., LaPorte, G., Aitken, C., ve Dror, I. E., 2012. Latent print examination and human factors: Improving the practice through a systems approach (No. NIST Interagency/Internal Report (NISTIR)-7842).

Thomas, P., ve Farrugia, K., 2013. An investigation into the enhancement of fingermarks in blood on paper with genipin and lawsone. Science & Justice, 53(3), 315-320.

# Contribution of dissolved sodium and dissolved chloride ions to total electrical conductivity of three selected water bodies

Sevtap KARAKURT

*General Directorate of State Hydraulic Works, 4th Regional Directorate, Konya TURKEY

skarakurt@dsi.gov.tr

## Abstract

Sodium (Na) and chloride (Cl) ions are two of the major constituents of surface waters besides calcium and sulfate. Dissolved sodium and chloride ions can be analyzed by various methods one of which is ion chromatographic method that is superior to the others because of its simplicity and reliability. Electrical conductivity is analyzed by electrochemical method and is the most common parameter of water analyses since it gives preliminary information about the dissolved ion concentration of water sample. There are various Turkish guidelines, Turkish standards and EPA limits for the maximum allowable concentrations of sodium and chloride ions in water. In this study, the contribution of sodium and chloride ions (in meq/L) to the total electrical conductivity of three selected water bodies were inquired between 2014 and 2019 and a low contribution to electrical conductivity, especially decreasing in cold weathers when compared with hot weathers were revealed.

**Keywords:** Electrical Conductivity, Dissolved Sodium, Dissolved Chloride

## INTRODUCTION

Electrical conductivity is an important parameter to provide a deep understanding of the character and ionic content of the water (K. Cano-Paoli, G. Chiogna, A. Bellin, Convenient use of electrical conductivity measurements to investigate hydrological processes in Alpine headwaters, Science of the total environment, 2019). The increase in ionic content corresponds to increase in electrical conductivity of the water. Inorganic or organic anions and cations in water samples are basically analyzed by ion chromatographic methods (P.R. Haddad, P.N. Resterenko, W.Buchberger, Recent developments and emerging directions in ion chromatography, J. Chromatogr. A, 1184 (2008) 456-473).

In this study, three water samples from Aksaray city were collected and their electrical conductivity, dissolved sodium and dissolved chloride analysis were performed in order to evaluate the supplement of the dissolved ions to the total electrical conductivity.

## MATERIALS AND METHODS

Electrical conductivity analysis were made by electrochemical method according to TS 9748 EN 27888. Calibrations of the conductivity-meter were made by 1413 µS/cm solution at 25°C.

Dissolved sodium and dissolved chloride ions were analyzed by ion chromatographic method according to TS EN ISO 14911 and TS EN ISO 10304-1, respectively. Calibration and check of the ion chromatography instrument was made by certified calibration solutions.

## RESULTS ("RESULTS and DISCUSSION" may be combined in a single title.)

Three water bodies of differing electrical conductivity values from Aksaray city of Turkey were selected as sources of water body and their sodium and chloride concentrations were determined by ion chromatography instrument which reveals the EC:Na and EC:Cl ratios between 2015 and 2019. Electrical conductivity analyses of the selected samples ranged between 610-778, 574-1650 and 130.7-493 µS/cm respectively. Dissolved sodium analyses of the selected samples ranged between 19.54-30.78, 48.14-75.42 and 4.43-34.74 mg/L

respectively. Dissolved chloride analyses of the selected samples ranged between 15.13-28.67, 48.20-69.96 and 4.04-24.81 mg/L respectively.

The contributions of sodium and chloride ions (especially chloride ions) to the total electrical conductivity were found to be low, especiallly at cold seasons.

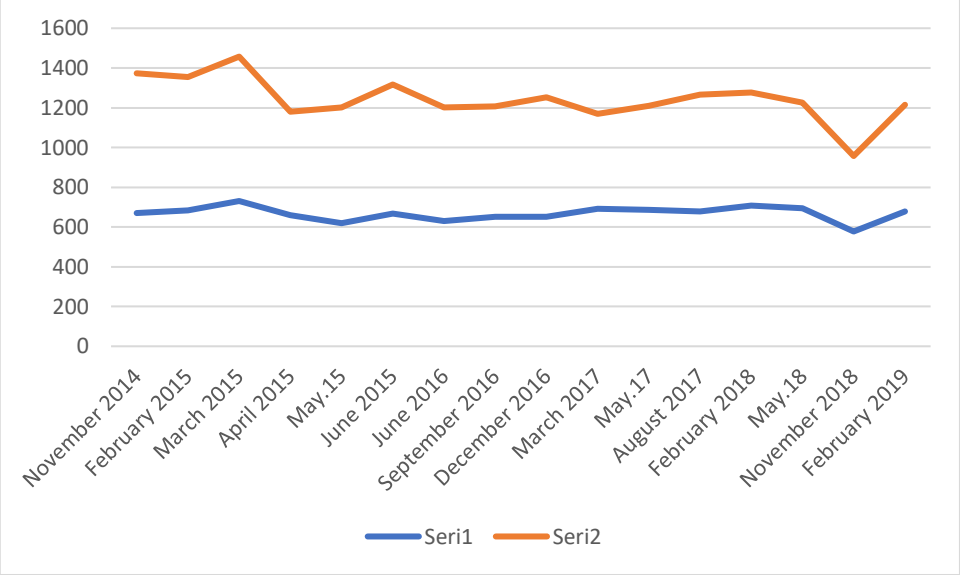



*Figure 16 EC/Na and EC/Cl ratios of the 1st sampling point between 2014 and 2019(Na and Cl are in meq/L)*

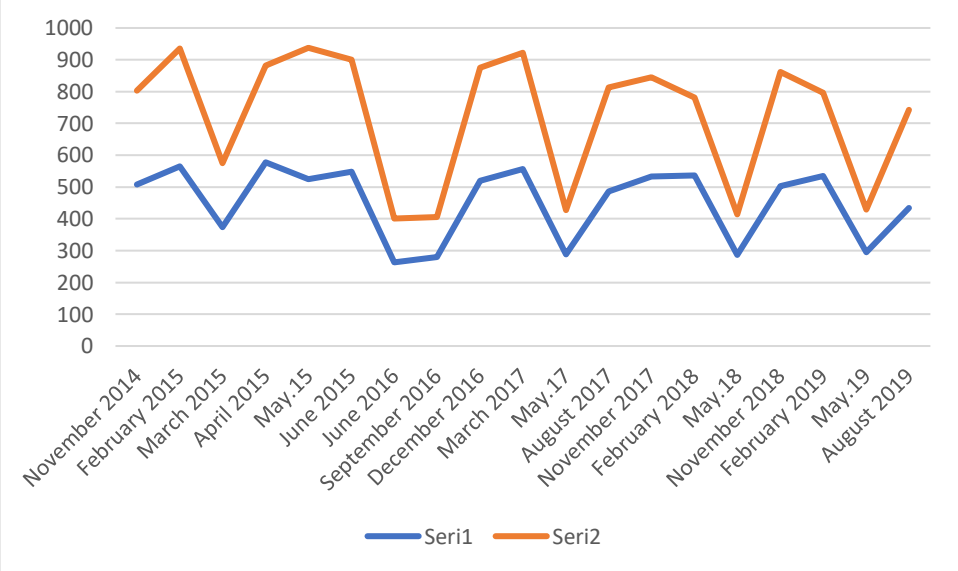



*Figure 17 EC/Na and EC/Cl ratios of the 2nd sampling point between 2014 and 2019 (Na and Cl are in meq/L)*

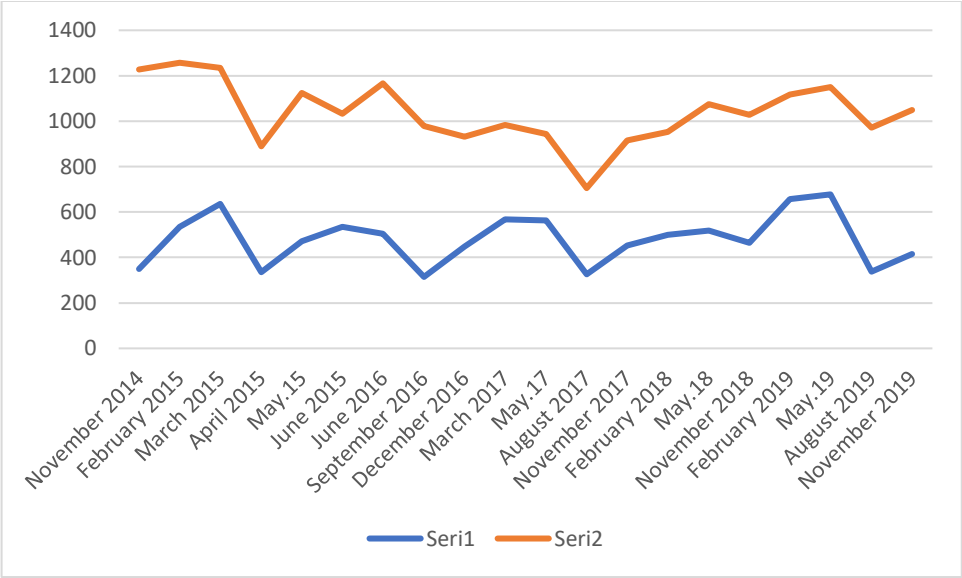



*Figure 18 EC/Na and EC/Cl ratios of the 2nd sampling point between 2014 and 2019 (Na and Cl are in meq/L)*

*Table 8 EC/Na and EC/Cl ratio ranges of the selected sampling points (Na and Cl are in meq/L)*

| Water body | Average EC/Na | Average EC/Cl |
|---|---|---|
| Aksaray Ağzıkarahan village bridge (n=16) | 667,06 | 1243,86 |
| Aksaray Kalanlar street bridge (n=19) | 453,31 | 723,40 |
| Aksaray Güzelyurt Ilısu village bridge (n=20) | 480,45 | 1036,84 |

## CONCLUSION

The selected water bodies have executed high EC/dissolved ion ratios objecting a low dissolved ion concentration and thus a low contribution to electrical conductivity, especially in cold weathers when compared with hot weathers. The ratio is specific to the subject water and is a characteristic property due to the total dissolved solid matter of the water sample. In order to characterize the basin in details, other sampling points and other dissolved ions in the basin should be inquired and EC/dissolved ion map of the basin should be drawn.

## REFERENCES

TS 9748 EN 27888

TS EN ISO 14911

TS EN ISO 10304-1

# Secondary metabolites of marine-derived *Aspergillus costaricaensis*

İbrahim Seyda Uras[1*], Sherif Saeed Ebada[2,3], Belma Konuklugil[4]

*[1]Ağrı İbrahim Çeçen University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Ağrı, Turkey.
[2]Mutah University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Al-Karak, Jordan.
[3]Ain Shams University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Cairo, Egypt.
[4]Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Ankara, Turkey

*Corresponding author e-mail: isuras@agri.edu.tr

## Abstract

The marine habitat is a rich source of bioactive compounds with pharmaceutical potential. Some of them are novel compounds with a novel mechanism of action. Marine microorganism such as fungi, bacteria as well as marine invertebrates (fungi, tunicates and etc.) have been proven to be a good source of compounds with intriguing structure and interesting biological activity including antimicrobial, anticancer, antiviral, antioxidant and anti-inflammatory properties have been reported. As part of our ongoing chemical investigation of biologically active metabolites from marine fungi, three known compounds; (Rubrofusarin B, decyl 3-(3,4,5-trihydroxyphenyl)propanoate and p-Hydroxyphenyl acetic acid methyl ester) were isolated from marine-derived fungi *Aspergillus costariacensis* isolated from *Petrosia ficiformis* which is collected from the Mediterranean Sea, Antalya, Turkey. Structures of the compounds was determined on the basis of NMR data comparison with spectroscopic data previously reported. Further identification of secondary metabolites of fungi is in progress.

**Keywords:** marine fungi, secondary metabolites, natural products.

## INTRODUCTION

Two thirds of the world is covered with water. Due to the special physical and chemical conditions in the sea and ocean environment, a wide variety of molecules with structurally unique properties are seen in many marine organisms. However, while terrestrial plants have a long history of medical use, marine organisms are still new in pharmacological practices (Schueffler and Anke, 2014).

In recent years, new secondary metabolites in different structures like polyketides, alkaloids, peptides, proteins, lipids, isoprenoids showing biological activity such as photoprotective, cytotoxic, anti-microtubule was discovered from marine organisms (Rateb and Ebel, 2011). Fungi are widely distributed in marine environments and many studies shown that sea sponges often have a rich fungal content from Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Phoma and Trichoderma genus.

Marine fungi are important sources of secondary metabolites for drug discovery purposes. Together with cephalosporins, one of the most famous examples, marine fungi have been shown to offer unique chemicals of clinical significance. (Javed et al., 2011). To date, hundreds of structurally unique and biologically active compounds have been reported from marine-derived fungi (Blunt et al., 2009; Bugni and Ireland, 2004).

In this study, 3 compounds obtained from marine derived *Aspergillus costaricaensis* fungi are presented.

## MATERIALS AND METHODS

### Fungal Material

The strain *Aspergillus costaricaensis* was separated from the sponge *Petrosia ficiformis*, which was collected from the coast of Çıralı, Antalya city in Turkey. For identification, this strain was cultured on saboraud dextrose agar (SDA) at room temperature for a week in an incubator. The strain was identified based on DNA amplification and ITS (Internal Transcribed Spacer) sequencing data analysis. The fungal sample was deposited in Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ankara University.

**Fermentation, Extraction and Purification**

The strain *Aspergillus costaricaensis* was incubated on saboraud dextrose agar (SDA) medium at 24 °C for a week to prepare the seed cultures, which was then transferred into 2 L Erlenmeyer flasks, each containing 100 g cooked rice. 4 weeks later, 350 mL EtOAc was added to each flask to stop the growth of cells. After adding EtOAc flasks shaked by shaker for 12 hours and EtOAc was removed under reduced pressure. Solvent added in flasks again and this process repeated untill solvent stay colorless in flasks. Then all EtOAc was removed under reduced pressure to yield a total residue. Total residue dissolved in 90% aqueous MeOH and extracted with n-hexane by liquid-liquid extraction. The aqueous MeOH phase was chromatographed on silica gel by vaccuum liquid chromatography using a gradient system of hexane–ethyl acetate(40:60, 30:70, 20:80, 10:90) and dichloromethane-methanol (100:0, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 15:85, 0:100) respectively, to afford eleven fractions (1-11).

Fraction 1 was chromatographed on Sephadex LH-20 column (%100 MeOH) to yield 4 subfractions (1.1-1.4). Subfraction 2 subjected on thin layer chromatography (TLC) and compound **3** (2.1 mg) purified by preparative TLC.

Fraction 2 was chromatographed on Sephadex LH-20 column (%100 Acetone) to yield 3 subfractions(2.1-2.3). Purification of subfraction 2.3 by using semipreparative HPLC eluted with Acetonitrile-$H_2O$ (0. min, 10:90(v/v), 2.0 ml/min, 5. min, 40:60 (v/v), 2.0 ml/min, 10. min, 60:40(v/v), 2.0 ml/min, 15. min 100:0(v/v) 2.0 ml/min, 20. Min, 90:10(v/v), 2.0 ml/min.) afforded compound **1** and **2**.

**RESULTS and DISCUSSION**

Compound 1 was isolated as yellow powder. Its HPLC chromatogram revealed maximal absorption peaks (λmax) at 233, 271, 326 and 407 nm. The 13C NMR spectrum of 1 (Table 1) exhibited the existence of sixteen carbon resonances distinguished via 2D NMR spectra namely HMBC and HMQC (Figure 1) into nine quaternary carbons, four methines and three methyl singlets.

**Table 1.** $^{1}H$ and $^{13}C$ NMR data of **1** in methanol-$d_4$ at 600 and 150 MHz, respectively.

| pos. | $\delta_H$ (multi, *J* [Hz]) | $\delta_C$, type |
|---|---|---|
| 2 | | 170.2, C |
| 3 | 6.07 (d, 1.0) | 107.8, CH |
| 4 | | 185.9, C |
| 4a | | 105.1, C |
| 5 | | 163.2, C |
| 5a | | 109.3, C |
| 6 | | 161.8, C |
| 7 | 6.46 (d, 2.2) | 98.5, CH |
| 8 | | 163.4, C |
| 9 | 6.76 (d, 2.2) | 99.1, CH |
| 9a | | 142.9, C |
| 10 | 7.10 (s) | 102.6, CH |
| 10a | | 154.6, C |
| 2-$CH_3$ | 2.40 (3H, d, 1.0) | 20.5, $CH_3$ |
| 6-$OCH_3$ | 3.93 (3H, s) | 56.4, $CH_3$ |
| 8-$OCH_3$ | 3.91 (3H, s) | 56.0, $CH_3$ |

The nine quaternary carbons can be further differentiated into one carbonyl (δC 185.9), two oxygenated olefinic carbons (δC 170.2 and δC 154.6) which altogether constitute to a γ-pyrone moiety. In addition, three oxygenated aromatic carbons were also noticed at δC 163.4, δC 163.2 and δC 161.8 along with three quaternary non-oxygenated carbons at δC 142.9, δC 109.3 and δC 105.1, respectively. The other carbon resonances were disclosed to be four methines at δC 107.8, δC 102.6, δC 99.1 and δC 98.5 together with three methyl singlets divided into two oxygenated (δC 56.4 and δC 56.0) and one aromatic methyl (δC 20.5). The 1H NMR data, 1H-1H COSY and ROESY spectra of 1 (Table 1, Figure 1) revealed the presence of two meta-coupled protons

at δH 6.76 and δH 6.46 with a coupling constant (J value) of 2.2 Hz which proved to be near to two methoxy protons at δH 3.91 and δH 3.93, respectively. The HMBC spectrum of 1 (Figure 1) displayed several key correlations indicating the structure of 1 to belong to γ-naphthopyrone skeleton as previously reported in literature (Shaaban et al., 2012; Graham et al., 2004; Sakurai et al., 2002). By comparing the obtained spectral data with the reported literature, compound 1 was unambiguously confirmed to be rubrafusarin B (Shaaban et al., 2012; Graham et al., 2004; Sakurai et al., 2002).

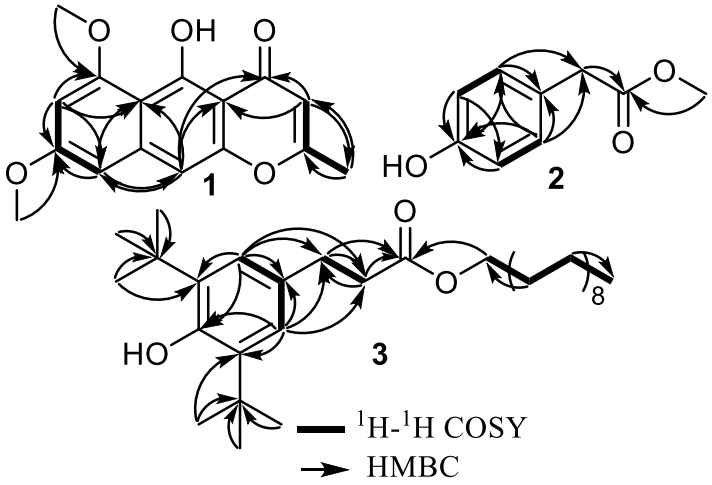



**Figure 1.** Key COSY and HMBC correlations of **1**-**3**.

Compound 2 was purified as yellow powder. Its 1H NMR data (Table 2) revealed the presence of a para-disubstituted aromatic ring via the existence of two proton resonances each integrated for two magnetically equivalent protons at δH 6.72 and at δH 7.07 with a similar coupling constant (J value) of 8.4 Hz.

**Table 2.** $^1$H and $^{13}$C NMR data of **2** in methanol-$d_4$ at 600 and 150 MHz, respectively.

| pos. | $\delta_H$ (multi, *J* [Hz]) | $\delta_C$, type |
|---|---|---|
| 1 | | 174.6, CO |
| 2 | 3.53 (2H, s) | 40.9, $CH_2$ |
| 3 | | 126.3, C |
| 4, 4’ | 6.72 (2H, d, 8.4) | 116.3, CH |
| 5, 5’ | 7.07 (2H, d, 8.4) | 131.3, CH |
| 6 | | 157.6, CO |
| 7 | 3.66 (3H, s) | 52.4, $CH_3$ |

In addition, a singlet methylene and a singlet oxygenated methyl groups were also identified at δH 3.53 and at δH 3.66 ppm, respectively. The 13C NMR data of 2 showed the presence of seven different peaks including two (δC 116.3 and δC 131.3) each represents two carbons and correlated through HMQC to the para-disubstituted aromatic ring. Apart from these two carbon resonances, 13C NMR data unraveled the presence of three quaternary carbons including one carboxyl group (δC 174.6), one oxygenated aromatic carbon (δC 157.6) and a quaternary aromatic carbon (δC 126.3). Based on the obtained data and by comparing with the reported literature, compound 2 was found to be methyl p-hydroxyphenyl acetate (Shen et al., 2013; Bose and Narsaiah, 2005). Further confirmation for the chemical structure of 2 was provided through HMBC spectrum (Figure 1) which revealed several key correlations such as long-range correlations from singlet methyl at δH 3.66 to a carboxyl group (C-1) assuring that compound 2 is a methyl ester together with long-range correlations from proton resonance at δH 6.72 to a methylene carbon at δC 40.9 indicating the identity of p-hydroxyphenyl acetic acid methyl ester.

Compound 3 was obtained as orange amorphous solid. Its molecular formula was confirmed to be C35H62O3 by HRESIMS which revealed a pseudomolecular ion peak at m/z 553.44992 [M+Na]+ (calcd. for C35H62O3¬Na 553.45967) indicating the presence of five degrees of unsaturation. The 1H NMR data of 3

(Table 3) revealed the existence of two electromagnetically equivalent aromatic protons at δH 6.99 indicating the existence of symmetric tetrasubstituted aromatic ring along with singlet proton resonance at δH 1.43 integrated for 18 protons indicating the presence of six electromagnetically methyls. It also revealed the presence of two adjacent methylene groups at δH 2.87 and δH 2.59 having a similar splitting pattern of doublet-doublet and coupling constant (J value) of 9.0 and 7.1 Hz. The 1H NMR spectrum of 3 also unambiguously confirmed the presence of an oxygentated octadecyl alkyl group based on the existed resonances and their integrations.

**Table 3.** $^{1}H$ and $^{13}C$ NMR data of **3** in chloroform-*d* at 600 and 150 MHz, respectively.

| pos. | $\delta_H$ (multi, *J* [Hz]) | $\delta_C$, type |
|---|---|---|
| 1 | | 173.5, CO |
| 2 | 2.59 (2H, dd, 9.0, 7.1) | 36.7, $CH_2$ |
| 3 | 2.87 (2H, dd, 9.0, 7.1) | 31.2, $CH_2$ |
| 4 | | 131.3, C |
| 5, 5’ | 6.99 (2H, s) | 124.9, CH |
| 6, 6’ | | 136.1, C |
| 7 | | 152.3, CO |
| 8, 8’ | | 34.5, C |
| 9-11, 9’-11’ | 1.43 (18H, s) | 30.5, $CH_3$ |
| 1” | 4.07 (2H, t, 6.9) | 64.8, $CH_2$ |
| 2” | 1.61 (2H, p, 6.9) | 28.8, $CH_2$ |
| 3”-17” | 1.26 (30H, m) | 23.0-32.0, $CH_2$ |
| 18” | 0.88 (3H, t, 7.0) | 14.3, $CH_3$ |

The 13C NMR data of 3 (Table 3) together with 2D NMR spectra such as 1H-1H COSY, HMBC and HMQC (Figure 1) disclosed several key correlations such as long-range correlations from proton resonances at δH 6.99 (H-5/H5’) to carbon resonances at δC 152.3 (C-7), δC 136.1 (C-6/C-6’), δC 131.3 (C-4), δC 36.7 (C-2) and δC 31.2 (C-3). In addition, the HMBC spectrum of 3 revealed long-range correlations from singlet methyls at δH 1.43 to two carbons at δC 136.1 (C-6/C-6’) and δC 34.5 (C-8/C-8’) together with a key correlations from methylene protons at δH 4.07 (C-1”) to a carboxyl carbon at δC 173.5 (C-1). Based on the obtained data and by comparison with the reported literature (Poofery et al., 2020), compound 3 was confirmed to be octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate.

Chemical structures of 3 compounds was given in Figure 2.

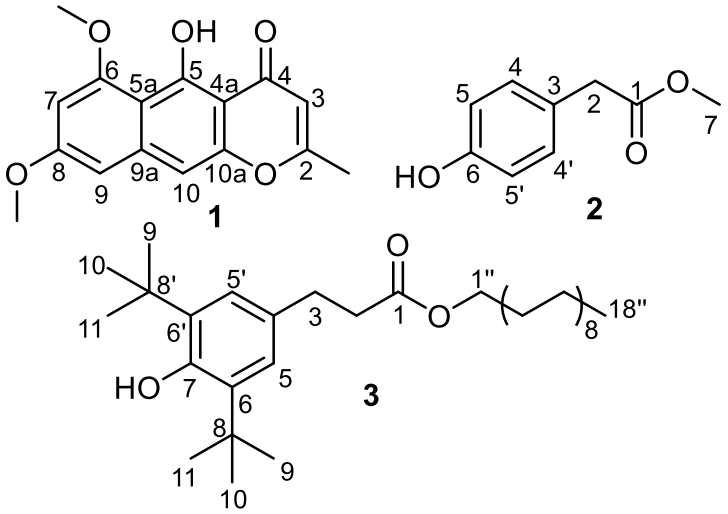



**Figure 2.** Chemical structures of 1-3.

## CONCLUSION

In the literature, there are no published studies on secondary metabolite isolation from *Aspergillus costaricaensis* fungi. These active substances were isolated for the first time from *Aspergillus costaricaensis* fungi. Also, this study is the first secondary metabolite isolation study made and published from this fungi.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like thanks to TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey) for supporting this project. (Project Number: 114S916)

## REFERENCES

Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR 2009. Marine natural products. Natural Product Reports, 26(2): 170-244.

Bose DS, Narsaiah, AV 2005. An efficient asymmetric synthesis of (S)-atenolol: using hydrolytic kinetic resolution. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 13: 627-630.

Bugni TS, Ireland CM 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. Natural Product Reports 21(1): 143-163.

Graham JG, Zhang H, Pendland SL, Santarsiero BD, Mesecar AD, Cabieses F, Farnsworth NR 2004. Antimycobacterial naphthpyrones from Senna obliqua. Journal of Natural Products, 67: 225-227.

Javed F, Qadir MI, Janbaz KH, Ali M 2011. Novel drugs from marine microorganisms. Critical Reviews in Microbiology, 37(3): 245-249.

Poofery J, Khaw-on P, Subhawa S, Sripanidkulchai B, Tantraworasin A, Saeteng S, Siwachat S, Lertprasertsuke N, Banjerdpongchai R 2020. Potential of Thai herbal extracts on lung cancer treatment by inducing apoptosis and synergizing chemotherapy. Molecules, 25: 231.

Rateb ME, Ebel R 2011. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. Natural Product Reports, 28(2): 290-344.

Sakurai M, Kohno J, Yamamoto K, Okuda T, Nishio M, Kawano K, Ohnuki T 2002. TMC-261 A1 and C1, new inhibitors of IL-4 signal transduction produced by Aspergillus niger var niger TC 1629. Journal of Antibiotics, 55: 685-692.

Schueffler A, Anke T 2014. Fungal natural products in research and development. Natural Product Reports, 31(10): 1425-1448.

Shaaban M, Shaaban KA, Abdel-Aziz MS 2012. Seven naphtho-γ-pyrones from the marine-derived fungus Alternaria alternata: Structure elucidation and biological properties. Organic and Medicinal Chemistry Letters, 2: 2-6.

Shen S, Li W, Wang J 2013. A novel and other bioactive secondary metabolites from a marine fungus Penicillium oxalicum 0312F1. Natural Product Research, 27: 2286-2291.

# Polikistik over sendromunda CYP450 regülasyonu

Naile Merve Güven* , Benay Can Eke

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: nmguven@ankara.edu.tr

## Özet

Oligo-ovülasyon veya anovülasyon, hiperandrojenizm ve ultrason incelemesinde polikistik yumurtalıkların varlığı ile karakterize olan polikistik over sendromu (PKOS), reprodüktif dönemdeki kadınları etkileyen bir endokrinopatidir. İnsülin direnci ve kompansatuar hiperinsülinemi, PKOS patofizyolojisinde kritik bir rol oynamaktadır. PKOS'un etiyolojisi açık olmamakla birlikte, çevresel faktörlerin androjen üretimini ve insülin sentezi/sekresyonunu etkileyen genler, steroid metabolizması ile obezite ve enerji regülasyonundan sorumlu genler gibi aday genlerle etkileşiminin sendromun ortaya çıkışında rol oynadığı varsayılmaktadır. Steroid biyosentezinde görev alan *CYP11A1, CYP17A1, CYP11B2, CYP19A1, CYP21A2 ile CYP1A1 ve CYP3A7* PKOS gelişimi ile ilgili olduğu düşünülen genlerdir. *CYP11A1*'in alelik varyantlarının artmış androjen sentezinde ve tüylenmede etkili olduğu belirtilmektedir. PKOS varlığında teka hücrelerinde artan *CYP17A1* gen ekspresyonu aşırı androjen üretimi ile ilişkilendirilmektedir. *CYP11B2*'yi kodlayan genin promotör bölgesindeki 344T / C tek nükleotid polimorfizminin, CYP11B2 aktivitesini etkileyerek ve androjen fazlalığına katkıda bulunarak PKOS patogenezini etkilediği ileri sürülmektedir. Androjenin östrojene dönüşümünden sorumlu olan CYP19A1 aktivitesinin PKOS'lu kadınların foliküllerinde azaldığı ve bundan kaynaklanan androjen fazlalığının anormal folikül gelişimine yol açtığı bildirilmektedir. CYP21A2 geninde görülen p.V281L mutasyonu ile östrojen/17-hidroksiprogesteron/testosteron seviyelerindeki dalgalanma ve PKOS sıklığı arasında anlamlı ilişki olduğunu gösteren veriler mevcuttur. *CYP1A1*3* alelini taşıyan bireylerde artan CYP1A1 aktivitesi ve katekol östrojen üretimindeki artış arasında ilişki görülebilmektedir. Bu nedenle, *CYP1A1* genindeki bu polimorfizmin folikülogenezisi bozarak PKOS patofizyolojisine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda *CYP3A7*1C* alelini taşıyan kişilerde dehidroepiandrosteron (DHEA) ve dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) atılımının artmasına bağlı olarak azalmış DHEAS seviyelerinin gözlenmesi, *CYP3A7*1C*'nin adrenal androjen fazlalığın düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Polikistik over sendromu, CYP450, genetik faktör

# Regulation of CYP450 in polycystic ovary syndrome

## Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS), which is characterized by oligo-ovulation or anovulation, hyperandrogenism and appearance of polycystic ovaries on ultrasound scanning, is an endocrinopathy that affects women of reproductive age. Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia are key players in the pathophysiology of PCOS. Although the etiology of PCOS is not clearly understood, it is postulated that the interaction of environmental factors with candidate genes such as genes that affect androgen production and insulin synthesis/secretion, steroid metabolism, and responsible for obesity and energy regulation contribute to occurence of syndrome. *CYP11A1, CYP17A1, CYP11B2, CYP19A1, CYP21A2, CYP1A1* and *CYP3A7* involved in biosynthetic pathway of steroid are genes thought to be associated with progress of PCOS. It is stated that allelic variants of *CYP11A1* gene are associated with excess androgen synthesis and hirsutism. Increased *CYP17A1* gene expression in PCOS theca cells is related excessive androgen production. The variants (T-->C) of -344T polymorphism site of *CYP11B2* gene predisposes increased risk of PCOS by affecting CYP11B2 enzyme activity and contributing to androgen excess. It is reported that CYP19A1 activity, which is responsible for the conversion of androgen to estrogen, decreases in the follicles of women with PCOS and the resulting androgen excess link with abnormal follicle development. There are findings of a study which show that there is a significant relationship between p.V281L mutation seen in the *CYP21A2* gene and deviation of estrogen / 17-hydroxyprogesterone / testosterone levels and the frequency of PCOS. It is postulated that an individual possessing *CYP1A1*3* polymorphism will have higher CYP1A1 enzyme activity and may modulate intraovarian production of catechol oestrogens, which in turn can contribute to the

pathophysiology of PCOS by disrupting folliculogenesis. It is suggested that the variant ***CYP3A7*1C*** may play a role in regulating DHEAS levels, via increasing the clearance of DHEA and DHEAS. Therefore, CYP3A7 may function as a modulator of adrenal androgen excess.
**Keywords:** Polycystic ovary syndrome, CYP450, genetic factor

## GİRİŞ

Hirsutizm ve anovulatuar infertilitenin ana nedeni olarak kabul edilen polikistik over sendromu (PKOS), reprodüktif dönemdeki kadınların yaklaşık %5 ila 15'ini etkileyen kompleks bir endokrinolojik bozukluktur. PKOS'lu kadınlar ayrıca glikoz intoleransı, diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon, hepatik steatoz kardiyovasküler hastalık ve endometrium kanseri açısından risk altındadır. (Crespo ve ark., 2018) PKOS'un tanı kriterlerinin net olarak ortaya koyulabilmesi için National Institute of Health-NIH, Rotterdam ve Androgen Excess Society olmak üzere üç büyük konsensus oluşturulmuş ve kriterler sunulmuştur. (Şentürk ve İmamoğlu, 2013) Günümüzde PKOS tanısı koyarken, 2003 yılında Rotterdam'da ESHRE/ASRM konferansında (İnsan Üremesi ve Embriyolojisi Avrupa Topluluğu / Amerika Üreme Tıbbi Derneği) kararlaştırılan parametrelerden (yumurtlama düzensizliği (oligo-ovulasyon veya anovulasyon), klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm, polikistik over morfolojisi) iki tanesinin saptanması PKOS tanısı koymak için yeterli olmaktadır. (Aydos ve ark., 2016) İnsülin rezistansı ve buna bağlı olarak ortaya çıkan kompansatuar hiperinsülinemi PKOS patofizyolojisinde major bir rol oynamaktadır. (Saygılı ve Baydur-Şahin, 2009) PKOS'un etiyolojisi kesin olarak bilinmese de sendrom genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkmış kompleks bir bozukluk olarak değerlendirilebilmektedir. (Adrenal ve gonadal hastalıklar kılavuzu, 2018) Steroid hormon sentezi ve faaliyetinde, karbonhidrat metabolizması ve enerji homeostasisinde, gonadotropin faaliyeti ve düzenlenmesinin yanı sıra insülin metabolizmasında yer alan genler, belirli PKOS bulgularından sorumlu olabilecekleri için seçilen ve araştırılan aday genlerdir. (Pehlivanoğlu, 2009) Steroid biyosentezinde görev alan *CYP11A1, CYP17A1, CYP11B2, CYP19A1, CYP21A2* ile *CYP1A1* ve *CYP3A7* PKOS gelişimi ile ilgili olduğu düşünülen genlerdir.

### CYP11A1

*CYP11A1* geni tarafından kodlanan kolesterol yan zincir yarılma enzimi, CYP11A1, cinsiyet hormonlarının sentezinde etkilidir. Adrenal ve gonadlarda steroid hormon sentezi, kolesterolün pregnenolona dönüşmesiyle başlamaktadır. Steroid hormon sentezinde başlangıç ve hız sınırlayıcı olan bu basamağı CYP11A1 katalizlemektedir. (Shih ve ark., 2014)

Reddy ve arkadaşları Güney Hindistanlı kadınlar üzerinde yaptıkları çalışma ile PKOS gelişme riski üzerinde *CYP11A1* polimorfizminin rolünü belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmanın sonucunda, *CYP11A1* geninin promotör bölgesinde bulunan pentanükleotit (tttta)n polimorfizminin PKOS için genetik yatkınlık oluşturduğu ortaya konmuştur. Çalışmanın sonuçları, > 8 tekrarlı alel taşıyan kadınlarda, diğer genotiplerden (< 8 ve = 8 tekrar) üç kat daha fazla PKOS gelişme riski olduğunu göstermektedir. Bu genin mikrosatelit alelik varyantlarının PKOS'ta görülen hiperandrojenik durum ile ilişkili olduğu bildirilse de Reddy ve arkadaşlarının çalışma popülasyonunda antropometrik ölçümleri ve klinik hiperandrojenik parametreleri etkilemeyeceği düşünülmektedir. (Reddy-Ranjith ve ark., 2014)

Zhang ve arkadaşları tarafından Çinli kadınlarda yapılan vaka kontrol çalışmasında *CYP11A1* geninin promotör bölgesine bulunan tek nükleotit polimorfizmi PKOS patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Bu polimorfizmin CYP11A1 enzim aktivitesini etkileyerek androjen üretiminde değişiklikler oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. *CYP11A1* geninin bu polimorfizmine ait 3 genotipte farklı testosteron seviyelerinin görülmesi bu sonucu desteklemektedir. (Zhang ve ark., 2012)

### CYP17A1

PKOS'ta over ve adrenal kökenli androjenik hormon konsantrasyonları artsa da, sendromda ortaya çıkan hiperandrojenizmin daha çok over kaynaklı olduğu düşünülmektedir. PKOS'lu kadınlarda ovulasyondan

sorumlu temel hormonlar olan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) arasındaki denge bozulmuştur ve LH düzeyleri artmıştır. LH overlerdeki teka hücrelerini stimüle etmekte ve androjen yapımını uyarmaktadır. Tekal androjenlerin sentezi, hem 17α-hidroksilaz hem de 17,20-liyaz aktivitesi bulunan ve pregnenolonun 17-hidroksi pregnenolona ve devamında dehidroepiandrosterona (DHEA) dönüştürülmesinden sorumlu olan *CYP17A1* (sitokrom P450c17α) geninin ekspresyonuna bağlıdır. PKOS varlığında teka hücrelerinde artan *CYP17A1* gen ekspresyonu ve buna bağlı olarak PKOS'lu kadınlarda hem 17α-hidroksilaz hem de 17,20-liyaz aktivitesinin artması aşırı androjen üretimi ile ilişkilendirilmektedir. (Ak-Yıldırım ve Memişoğulları, 2011; Baysal, 2008; Baran, 2009)

**CYP11B2**

İnsanlarda kortizol sentezinde görev alan CYP11B1 (11βhidroksilaz) ve aldosteron sentezinde görev alan CYP11B2 (aldosteron sentaz) olmak üzere 2 tane 11β-hidroksilaz izoenzimi bulunmaktadır. Aldosteron sentazın 11β-hidroksilaz aktivitesi vardır. Ayrıca, kortikosterondan aldosteron sentezinde yer alan 18-hidroksilasyon ve 18-oksidasyon basamaklarını katalizlemektedir. *CYP11B2* geninde oluşan mutasyonlar nedeniyle aldosteron sentaz eksikliği meydana gelmekte ve bu enzimin eksikliğine bağlı olarak 11-deoksikortizol, 11-deoksikortikosteron, 17-hidroksiprogesteron birikimi ve adrenokortikotropik hormon miktarında artış gözlenmektedir. (Kıraç, 2009)

Zhao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *CYP11B2* geninin promotör bölgesinde bulunan -344T polimorfizmi ile PKOS patogenezi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, *CYP11B2* geninin hem promotör bölgesi olan hem de polimorfizmin görüldüğü bölge olan -344 bölgesindeki varyantların (T -> C), PKOS gelişme riskini arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca, -344CC ve 344TC genotiplerinin PKOS'a duyarlı genotipler olabileceği ve bu genotiplerin PKOS'ta yumurtalık renin anjiyotensin sisteminin artmış aktivitesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. (Zhao ve ark., 2003)

**CYP21A2**

*CYP21A2* geni tarafından kodlanan 21-hidroksilaz enzimi steroidogeneziste 17-hidroksi progesteronun 11-deoksikortizole dönüşümünden sorumludur. 21-hidroksilaz enzimi eksikliğinde progesteron ve 17-hidroksiprogesteron düzeyleri belirgin olarak artmaktadır. 21-hidroksilaz enziminin eksikliği ve artmış serum 17-hidroksiprogesteron seviyeleri arasında bir ilişki bulunması fonksiyonel hiperandrojenizmi veya PKOS'u olan kadınlarda yaygın bir bulgudur. *CYP21A2* genindeki mutasyonlar aldosteron ve kortizol seviyelerinde azalmaya ; testosteron ve dihidrotestosteron üretiminde ise artışa yol açmaktadır. (Herodež ve ark., 2018)

Herodez ve arkadaşlarının *CYP21A2* geninde görülen 4 yaygın mutasyon (p.P30L, c.290–13A/C>G, p.I172N, p.V281L) ile çeşitli klinik ve laboratuvar parametreleri arasındaki ilişkiyi araştırdığı bir çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmada, *CYP21A2* geninde görülen p.V281L mutasyonu ile östrojen/17-hidroksiprogesteron/testosteron seviyelerindeki değişiklikler ve PKOS sıklığı arasında anlamlı ilişki olduğunu gösteren veriler mevcuttur. (Herodež ve ark., 2018)

**CYP19A1**

*CYP19A1* geni tarafından kodlanan aromataz enzimi testosteronun östradiole ve androstenedionun östrona dönüşümünden ve bu şekilde her iki cinsiyette de cinsiyet hormonları arasındaki dengenin sürdürülmesinden sorumludur. Sağlıklı kadınlarla karşılaştırıldığında, PKOS'lu kadınlara ait foliküler sıvıda aromataz aktivitesi azalmıştır ve PKOS hastalarının antral foliküllerinden elde edilen granüloza hücrelerinin düşük aromataz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. *CYP19A1* polimorfizmlerinin plazma testosteron seviyeleri ile ilişkilendirilmesi nedeniyle, *CYP19A1* varyantlarının hiperandrojenik PKOS fenotipinin gelişmesinde genetik bir faktör olabileceği düşünülmektedir. (Hui ve ark., 2011)

Wang ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada *CYP19A1*'deki yaygın genetik varyasyonların PKOS riskine katkılarının ne olduğunu araştırmışlardır. Çalışma için önce büyük bir vaka kontrol çalışmasını inceleyerek

*CYP19A1*'in Arg264Cys varyantının PKOS riskine katkıda bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Bunun devamında yaptıkları in vitro analiz ile bu varyantın ekspresyonunun aromataz aktivitesini arttırmak suretiyle değiştirebileceğini bulmuşlardır. Bu varyantın frekansının PKOS grubunda daha düşük olduğu olması ise aromataz enzim aktivitesinin PKOS'lu kadınlara daha düşük olduğunu düşündürmektedir. (Hui ve ark., 2011)

**CYP1A1**

Östrojen overler da dahil ekstrahepatik dokularda CYP1A1 tarafından 2 ve 4 hidroksi katekol östrojene oksitlenmektedir. Domuz modelinde katekol östrojenlerin granuloza hücre DNA replikasyonunu ve folikülogenezisi (foliküler büyümeyi) inhibe ettiği açıkça gösterilmiştir. (Esinler ve ark., 2008)

Esinler ve arkadaşları; Akgül ve arkadaşları tarafından yapılan iki ayrı çalışmada *CYP1A1* geninin 7.ekzon 462.kodonunda bulunan, izolösin ve valinin yer değiştirmesinden kaynaklanan, polimorfizm nedeniyle *CYP1A1*3* alelini taşıyan bireylerde CYP1A1 enzim aktivitesinde ve buna bağlı olarak intraovarian katekol östrojen üretiminde de artış görüldüğü kaydedilmiştir. Her iki çalışmada da PCOS'lu bireylerde *CYP1A1* izolösin (Ile)/valin (Val) alel oranının kontrollere göre daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Artmış CYP1A1 aktivitesine bağlı olarak yüksek konsantrasyonda üretilen katekol östrojenlerin folikülogenezisi bozmak suretiyle PKOS patofizyolojisine katkıda bulunacağı ileri sürülmektedir. (Esinler ve ark., 2008; Akgül ve ark., 2011)

**CYP3A7**

PKOS'ta androjenin majör kaynağının overler olduğu düşünülse de, hastaların yaklaşık % 20 ila 30'nda artmış adrenal androjen seviyeleri, özellikle dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), görülmektedir. Adrenal korteksin zona retiküler bölgesinden DHEA ve DHEAS salgılanmaktadır. DHEAS adrenal androjen fazlalığının değerlendirilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. CYP3A7 DHEA ve DHEAS'ın 16 α - hidroksilasyonunu katalizlemekte ve atılımlarını kolaylaştırmaktadır. CYP3A7 fetal karaciğerde, promotör varyantı olan *CYP3A7*1C* ise yetişkin karaciğerinde eksprese olmaktadır. (Goodarzi ve ark., 2008)

Goodarzi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *CYP3A7*1C* alelini taşıyan kişilerde DHEA ve DHEAS atılımında artma ve buna bağlı olarak DHEAS seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Bu sonuca göre, *CYP3A7*1C* alelinin PKOS'ta görülen adrenal androjen fazlalığının düzenlenmesinde koruyucu bir faktör olabileceği düşünülmüştür. (Goodarzi ve ark., 2008)

**SONUÇ**

Çevresel faktörlerin yanı sıra PKOS'un etiyolojisinde genetik faktörler önemli bir etkiye sahiptir ve bir çok aday genin PKOS'nun nedenlerinden biri olduğu belirlenmiştir. Aday olarak tanımlanan genlerdeki herhangi bir değişiklik ya da defekt çeşitli yolakları etkileyerek yumurtalık disfonksiyonunun ilerlemesine ve PKOS gelişimine yol açabilmektedir. Kilo kaybı/kontrolü, sağlıklı beslenme, önerilen ilaçların düzenli kullanımın yanı sıra PKOS'un genetik temelinin aydınlatılması; sendromun ve fenotiplerinin tanısını koyabilmek, sendrom ile ilişkili komorbiditelere erken müdahale edebilmek ve kişiselleştirilmiş ve bu şekilde daha etkili tedavi yaklaşımları belirleyebilmek açısından önem taşımaktadır.

**KAYNAKLAR**

Adrenal ve gonadal hastalıklar kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2018.

Akgül S, Derman O, Alikaşifoğlu M, Aktaş D 2011. CYP1A1 polymorphism in adolescents with polycystic ovary syndrome. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 112(1):8-10.

Ak-Yıldırım H, Memişoğulları R 2011. Polikistik Over Sendromu'nda Gözlenen Biyokimyasal Bozukluklar .Konuralp Tıp Dergisi. 3(1):42-48.

Aydos A, Öztemur Y, Gür-Dedeoğlu B 2016. Polikistik over sendromu ve moleküler yaklaşımlar. Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology / Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji, 73 (1): 81–88.

Baran ŞY 2009. Polikistik over senromlu infertil hastalarda ovulasyon indüksiyonunda metformin ve klomifen sitratın karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, İstanbul.

Baysal B 2008. Polikistik over sendromu ve hirşutizm. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri/Adolesan Sağlığı II/Sempozyum Dizisi No:63 99-107.

Crespo RP, Bachega TASS, Mendonça BB, Gomes LG 2018. An update of genetic basis of PCOS pathogenesis. Archives of Endocrinology and Metabolism, 62 (3): 352–61.

Esinler I, Aktas D, Otegen U, Alikasifoglu M, Yarali H, Tuncbilek E 2008. CYP1A1 gene polymorphism and polycystic ovary syndrome. Reproductive biomedicine online. 16(3):356-360.

Goodarzi MO, Xu N, Azziz R 2008. Association of CYP3A7*1C and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in women with polycystic ovary syndrome. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 93(7), 2909–2912.

Herodež ŠS, Fijavž L, Zagradišnik B, Došen M, Takač I, Kokalj-Vokač N 2018. Mutations of the CYP21A2 gene: Association of p.V281L mutation with polycystic ovarian syndrome (PCOS). ACTA MEDICO–BIOTECHNICA. 11 (2): 39–49.

Hui W, Qiaoli L, Teng W, Guizhong Y, Ying W, Xiaoping Z, Qing S, Huan W, Xinzhi Z, Qinghe X, Juanzi S, Lin H, Lei W 2011. A common polymorphism in the human aromatase gene alters the risk for polycystic ovary syndrome and modifies aromatase activity in vitro. Molecular Human Reproduction. (6):386

Kıraç D 2009. Konjenital adrenal hiperplazili bireylerde, 21 hidroksilaz gen kusurlarının sıklığı, fenotipik etkileri ve diğer moleküler mekanizmalar. Doktora tezi, İstanbul.

Pehlivanoğlu V 2009. Polikistik over sendromlu hastaların reproduktif çağdaki anne ve kız kardeşlerinde endokrin ve metabolik parametrelerin değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, İstanbul.

Reddy-Ranjith K, Deepika M.LN, Supriya K, Prasanna-Latha K, Lakshmana-Rao SS, Usha-Rani V, Jahan P 2014. CYP11A1 microsatellite (tttta)n polymorphism in PCOS women from South India. Journal of Assisted Reproduction and Genetics: Official Publication of ALPHA, Scientists in Reproductive Medicine 31 (7): 857.

Saygılı F, Baydur-Şahin S 2009. Polikistik over sendromunda insülin direncine yönelik tedavi. Türkiye Klinikleri Endokrinoloji - Özel Konular, 2(2):37-42.

Shih M, Hsu HJ, Lan HC, Weng J 2014. Steroidogenic Cytochrome P450 Gene CYP11A1: Functions and Regulation. Fifty Years of Cytochrome P450 Research. s : 259.

Şentürk LM, İmamoğlu M 2013. Polikistik over sendromunda klinik ve tanı kriterleri. Turkiye Klinikleri Gynecology Obstetrics - Special Topics, 6(4):10-6.

Zhang C, Zhang X, Xia Y, Cao Y, Wang W, Xu P, Che Y, Wu X, Yi L, Gao Q, Wang, Y 2012. Association between polymorphisms of the CYP11A1 gene and polycystic ovary syndrome in Chinese women. Molecular Biology Reports: An International Journal on Molecular and Cellular Biology. 39 (8): 8379.

Zhao SP, Tang XM, Shao DH, Dai HY, Dai SZ 2003. Association study between a polymorphism of aldosterone synthetase gene and the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 38(2):94-7.

# Milk added to beverages affect the color stability of composite resins?

Ezgi Sonkaya[1*], Begüm Erpaçal[2]

[*1] University of Çukurova, Faculty of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Adana, Turkey
[2]University of Dicle, Faculty of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Diyarbakır, Turkey

*sonkayaezgi@yahoo.com

**Abstract:** Discoloration of dental composites can affect the appearance of aesthetic restorations. The aim of this study is to compare the color stability of the materials of different brand aesthetic dental composite materials used. **Material and Methods:** 50 samples of 5mm diameter and 2mm thickness were prepared from three different composite restoration materials (Gc G-Eanial, 3M Filtek Ultimate and Kuraray Clearfil Majesty Esthetic). Samples were separated to be placed in five different beverages (distilled water, filter coffee, milk filter coffee, tea, milk tea) (n = 10). Samples were kept in beverages at 37 ° C for 30 days. L *, a *, b * values were recorded using spectrophotometer (Vita Easyshade) before immersion in beverages (0. day) and in the following days (1st day, 7th day and 30th days). ΔE * values were calculated. Two-way analysis of variance was used to determine the effects of material and beverage factors on color change, and Tukey's HSD post hoc test was used to detect differences between groups (α = 0.05). **Results:** At the end of the first day, the least coloration was observed in the GC composite, which was kept in milk tea, and in the 1st week and in the 1st month, Kuraray composite that was kept in milk tea. On day 1, week 1 and month 1, the most color change occurred in the samples kept in the tea. **Conclusion**: It was concluded that the milk added to tea and coffee reduced the color change in composite resins. The color stability of composite restorations varies depending on the type of material used and the type of beverage. The color stability of composite restoration varies depending on the type of material used and the type of beverage.
**Key Words:** Composite resin, aesthetics, coloration

## Introduction

Composite resins are frequently used in dentistry, especially on anterior restorations, with their aesthetic properties, high workability and acceptable biocompatibility (Nasim et al., 2010). However, they undergo a discoloration in long term oral usage and this is shown as one of their biggest disadvantages. The unacceptable discoloration is one of the prominent reason for renewing of the composite resin restorations (Wilson et al.,1997). Restorative materials tighten up by undergoing a series of polymerization reactions and undergo polymerization shrinkage. Meanwhile, hygroscopic absorption of the water causes swelling and weight increase in the material as a result of prolonged interaction in the oral environment. As a result, the resin matrix softens and color resistance of the material is decreased (Yap and Wee, 2002) (Yap et al., 2000). The ability of the composite resin to absorb water indicates that it can also absorb other liquids containing color pigments and thus cause discoloration (Bagheri et al., 2005).

Discoloration in composite resins results from internal and/or external factors. There are many internal factors that affect the color of light-cured restorative dental materials such as the resin matrix of the material, the chemical change of the tertiary aromatic amines in its content, quality/quantity of both filler and the initiator (Santos et al., 2012). The external discoloration is mainly due to the colorants found in foods or beverages (Catelan et al., 2011). Previous studies have shown that composite resins are sensitive to coloration, especially when exposed to various staining factors such as red wine, coffee, cola, tea and whiskey (Patel et al., 2004) (Bagheri et al., 2005).

Absorption is the sorption process which a fluid or gas enter another liquid or solid substance (absorbent). Also, adsorption is the process of sticking atoms, ions, or molecules of gas or liquid substance on the surface of the absorbent material. Adsorption signifies to a surface-based process. Colorants cause the coloring of composite resins by mechanisms such as adsorption or absorption (Abu -bakr et al., 2000).

Colorimetry is a branch of color science and is based on the digital expression of color reflected from the object. Two-color systems are generally used. These are the Munsell color system and the Standard

Commission Internationale de L'Eclairage (CIE L * a * b *) color system. According to CIE L * a * b * differential color system, all colors in nature are obtained by combining three basic colors (red, blue and green) in specific proportions. This technique is widely used by dental researchers in the study of colors of various materials (Johnson and Kao, 1989). L is on the vertical axis between the black (-) and white (+) range of the brightness coordinates of the object; a is on the horizontal axis between the object's red (+) and green (-) chroma values; b is on the horizontal axis between the yellow (+) and blue (-) as well represents chroma values. The intersection of these three points gives the coordinate of that color (Kahramanoğlu and Kulak, 2013).

Turkey has one of the highest tea consumption rate in the world. Coffee consumption has become widespread also in our country with third generation coffee trend of recent years. Coffee and tea are drinks with discoloring ability. In Turkey, tea consumption period is long due to common habit of the society. As expected number of polyphenols in the drinks will increase, and lead to increase of teeth and restoration discolorations (Özdemir and Şahin, 2007). The aim of this study is to examine whether the discoloration feature of the polyphenols in tea and coffee changes by adding milk or not.

**Matherials and methods**

In this study, the effect of five different drinks (filter coffee, coffee with milk, tea, tea with milk and distilled water) on color stability of three different composite materials (G-ænial, GC Corporation, Tokyo, Japan; Clearfil Majesty Esthetic, Kuraray Dental Inc, Okayama, Japan and 3M ™ Filtek™ Ultimate Universal Restoratif, St. Paul, USA) were evaluated (Table 1).

*Table 1. Chemical structures of composite resins and properties of standard monomers*

| Product name | Composition | |
|---|---|---|
| **G-ænial** (GC Corporation, Tokyo, Japan) | The filler contains free-standing silica particles, strontium glass, lanthanoid fluoride, fluoroaluminosilicate, catalysts, pigments, mix of different dimethacrylate co-monomers. The inorganic filler ratio in the methacrylate matrix was 87% (76% by volume). UDMA %12-14 içerir. | Microfil hybrid Composite |
| **Clearfil Majesty Posterior** (Kuraray Dental Inc, Japan) | Hydrophobic aromatic dimethacrylate, silanated glass ceramics, surface treated alumina micro filler, silanated silica filler, dl-Camphorquinone, accelerators, pigments, others. The inorganic filler ratio in the methacrylate matrix was 92% by weight (82% by volume). Bis-GMA %<3, UDMA, TEGDMA %<3 | Nanohybrid Composite |
| **Filtek Ultimate Supreme XTE** (3M™ ESPE™ St. Paul, USA) | The filler contains free-standing 20nm silica particles, 4-11nm zirconium particles and clusters together. The inorganic filler ratio in the methacrylate matrix was 78.5% (63.3% by volume). Bis-GMA %1-10, UDMA, TEGDMA %< 1, PEGDMA %< 5, BIS-EMA | Nanofil Composite |

Standard teflon molds that 8mm diameter and 2mm height were used for the preparation of composite samples. All in A2 color composite resins were placed in molds. Transparent tape (Universal strips, Extra Dental, Istanbul, Turkey) and glass slide were applied to both sides of samples then overflow material was removed. The samples were polymerised with an LED light curing unit (Woodpecker LED B, Guilin Zhuomuniao Medical Devices, China) according to the manufacturers' instructions. The light intensity of the curing unit was controlled with a radiometer. Sof-Lex polishing discs (3M ™ ESPE ™, St Paul, USA) were used to remove the oxygen inhibition zone. All samples were submerged in distilled water for 24 hours at 37°C before the initial color measurements were performed. They dried with blotter paper. 50 samples prepared for each material were randomly divided into five groups (n = 10).

The initial color values of samples were measured using a dental spectrophotometer (Easyshade Advance; Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Germany). Measurements were performed using a white back ground and under D65 standard lighting conditions, according to the manufacturer's instructions. The device was calibrated before every measurement. Average of L, a and b values were recorded by repeating the measurements three times on each sample surface. After determining the initial color values, five different drinks were prepared;

Group 1: Coffee; 100 ml filter coffee (in Columbia coffee bean, Tchibo)

Group 2: Coffee + Milk; 100 ml filter coffee + 100 ml milk (3% whole milk, Sek, Turkey)

Group 3: Tea; 1 teabag (Yellow Label Tea, Lipton, London, Turkey) were steeped in 200 ml boiling water for 10 min.

Group 4: Tea + Milk; 100 ml tea + 100 ml milk (Yellow Label Tea, Lipton, Rize, Turkey + 3% whole milk, Sek, Turkey)

Group 5: Control group; Distilled water

Drinks were changed daily. Color measurements were repeated after 1, 7 and 30 days. Before all measurements, each sample was washed with distilled water on 10 seconds and then dried with blotter paper. $L_0$, $a_0$ and $b_0$ values are the initial values, also $L_1$, $a_1$ and $b_1$ values represent the CIE L * a * b * values measured in each coloration period of the samples ($\Delta L = L_1^* - L_0^*$, $\Delta a = a_1^* - a_0^*$ and $\Delta b = b_1^* - b_0^*$). The discoloration was calculated using the formula;

$\Delta E = [(\Delta L)\ 2 + (\Delta a)\ 2 + (\Delta b)\ 2]\ ½$.

SPSS 21.0 computer software program was used for statistical analysis of the results. Kruskal-Wallis ANOVA test was applied to the groups. In the variables with differentiation, the groups were compared in pairs with the Mann-Whitney U test.

**Results**

The discoloration average ΔE and standard deviation values caused by solutions in composite resins are given in Table 2.

Table 2. Average ΔE and standard deviation values of composite resins after discoloration

| Composites | Beverages | Day 1 | Day 7 | Day 30 |
|---|---|---|---|---|
| **G-ænial** | **Filter Coffee** | 3,77 ±1,25 | 6,05 ±0,73 | 7,4 ±0,83 |
| | **Coffee with milk** | 3,71 ±2,21 | 4,37 ±1,04 | 3,28 ±0,78 |
| | **Tea** | 8,51 ±2,28 | 6,08 ±0,58 | 7,41 ±0,58 |
| | **Tae with milk** | 1,54 ±0,87 | 4,25 ±0,72 | 2,37 ±0,94 |
| | **Distilled water** | 2,39 ±1,23 | 1,39 ±1,10 | 1,77 ±1,10 |
| **Clearfil Majesty Posterior** | **Filter Coffee** | 3,70 ±1,41 | 2,96 ±1,03 | 4,67 ±0,96 |
| | **Coffee with milk** | 2,86 ±1,68 | 3,93 ±0,94 | 2,92 ±1,12 |
| | **Tea** | 3,59 ±1,36 | 3,89 ±2,39 | 7,70 ±0,49 |
| | **Tae with milk** | 3,35 ±2,45 | 2,31 ±1,91 | 2,17 ±1,13 |
| | **Distilled water** | 0,94 ±0,55 | 0,63 ±0,33 | 0,79 ±0,51 |
| **Filtek Ultimate Supreme** | **Filter Coffee** | 7,21 ±2,71 | 6,17 ±1,06 | 7,45 ±1,63 |
| | **Coffee with milk** | 5,83 ±1,79 | 3,68 ±1,62 | 7,68 ±1,52 |
| | **Tea** | 6,31 ±1,92 | 4,81 ±0,90 | 8,03 ±0,58 |
| | **Tae with milk** | 2,11 ±1,81 | 4,75 ±0,97 | 6,02 ±1,47 |
| | **Distilled water** | 0,90 ±0,63 | 0,68 ±0,4 | 1,29 ±0,82 |

On day 1, there was a significant difference in the coloring of Filtek composite in coffee compared to other composites, while there were significant differences coloring of all composites when in used of tea ($p < 0.05$). The highest coloration value was observed on day 1 in GC composite storage in tea. There was no significant difference between composites in coffee + milk and tea + milk beverages ($p > 0.05$). In the control group, there was significant difference in discoloration of GC composite ($p < 0.05$) (Figure 1).

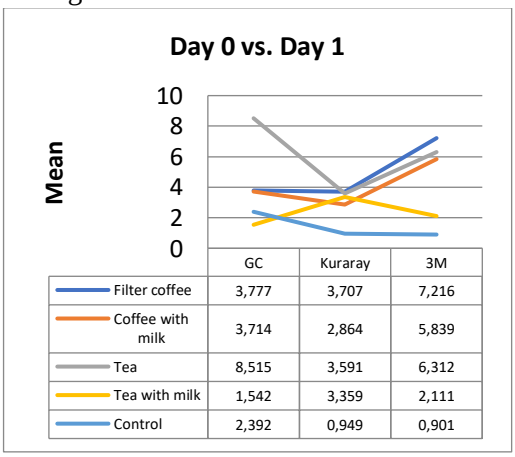



*Figure 1: Comparison of ΔE values at the end of the 24h*

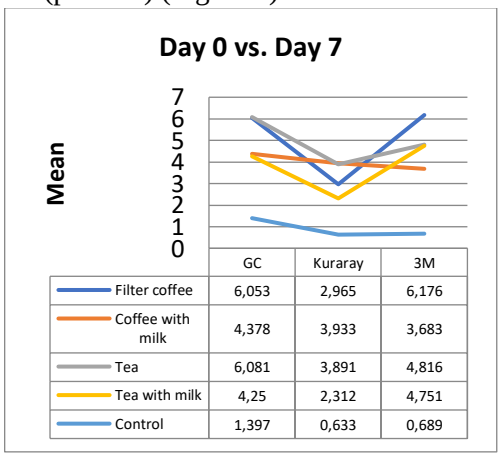


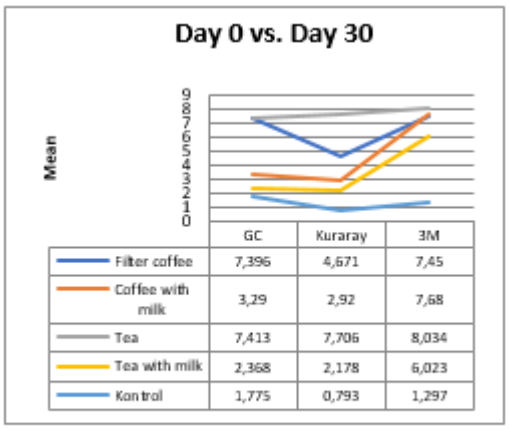

*Figure 2: Comparison of ΔE values at the end of the day 7*

*On the day 7, there was a significant difference discoloration of Clearfil Majesty composite in coffee and tea + milk drinks compared to other composites. There was a statistically significant difference*

*discoloration of all composites in the tea (p <0.05). No significant differences were observed discoloration of composites in coffee + milk beverage and in the control group (p> 0.05) (Figure 2).*

On day 30, there was a significant difference discoloration of Clearfil Majesty in coffee compared to other composites, while there was no significant difference of all composites storage in tea (p> 0.05). There were statistically significant differences in coffee + milk and tea + milk between other composites and 3M (p <0.05) (Figure 3).

The lowest mean ΔE* values was seen in GC composite on day 1, Kuraray composite on day 7 and day 30 which were storage in tea with milk. It was found that Kuraray showed the minimum discoloration on all days and solutions, except that in tea with milk and distilled water on day 1 and in tea on day 30.
On all measurement days, the highest mean *ΔE** values were observed in the samples immersed in tea. Moreover, the study has shown that adding milk to both coffee and tea reduced discoloration.




| | GC | Kuraray | 3M |
|---|---|---|---|
| Filter coffee | 7,396 | 4,671 | 7,45 |
| Coffee with milk | 3,29 | 2,92 | 7,68 |
| Tea | 7,413 | 7,706 | 8,034 |
| Tea with milk | 2,368 | 2,178 | 6,023 |
| Kontrol | 1,775 | 0,793 | 1,297 |

Figure 3: Comparison of ΔE values at the end of the day 30

**Discussion**

Restorative materials are sensitive to discoloration due to intrinsic or extrinsic factors. Extrinsic factors are mainly colorings due to absorption or adsorption of exogenous such as food and beverage (Hotwani et al., 2014).

In this study, significant differences were reported between composites of tested and the different staining solutions. These results match those observed in earlier studies (Mundim et al., 2011) (Ren et al., 2012) (Awliya et al., 2010) (Poggio et al., 2016) (Leite et al., 2014) (Llena et al., 2017) (Al-Dharrab, 2013).

In this study The CIEL * a * b system was preferred to evaluate discoloration because it is adequate for determining even low color differences and has advantages such as sensitivity, repeatability, and objectivity (Festuccia et al., 2012). This color system has also been used in many studies (Ren et al., 2012) (Awliya et al., 2010) (Poggio et al., 2016) (Leite et al., 2014) (Llena et al., 2017) (Al-Dharrab, 2013).

A strong relationship between discoloration capability of resin and hydrophilic or hydrophobic properties of the material has been reported in the literature. If a resin is more hydrophilic, it shows higher water sorption. If the material absorbs water, it can also absorb water-soluble coloring agents. For example, UDMA-based monomers show lower discoloring values than other dimethacrylate-based monomer types. This can be explained by the low viscosity and low water absorption of urethane dimethacrylate besides its successful polymerization with visible light (Douglas and Craig, 1982). High TEGDMA in resins with high Bis-GMA content causes an increase in water absorption. Tarumi et al. said this was due to the increased surface hydrophilicity. Hydrophilic groups such as the ethoxy group in TEGDMA show affinity to the water molecule by binding hydrogen to oxygen. (Mazato et al., 1999). In our study, in according to the results, also Filtek Supreme composite, whose filler amount is lower in volume, is more discolored. This finding confirms the association between discoloration and higher Bis-GMA and TEGDMA proportion

Awliya et al. (2010) in their study, they compared microhybrid and nanofilled composite resins and observed that nanofilled composites are more prone to discoloration (Awliya et al., 2010). In our study, a microfill, a nanofill, and a nanohybrid composite were compared. The results of this study indicate that nanofill based Filtek Supreme occurred more discoloration.

Poggio et al. (2006) evaluated the color stability of different restorative materials (microfill, nanofill, nanohybrid and ormoser based composites) after exposure to different staining solutions (coffee, cola and red wine). They found that cola and red wine do not affect color stability for all restorative materials except Filtek

Supreme XTE, although coffee causes a significant discoloring in all tested composite resins (Poggio et al., 2016).

Coffee and tea have yellow-pigmented polyphenols on different polarity (Proctor, 2005). There are various proline-rich proteins (such as mucin, histatin, cystatin) in human saliva, that can complex with polyphenols (Hagerman et al., 1981). Also saliva affects the coloring of the tooth surface as it prepares the environment for the adhesion of the pellicle containing these complexes to the tooth surfaces (Lendermann et al., 2000).

As Darabi points out in coffee solution, both the adsorption and absorption of the yellow pigments cause discoloration in composite, while in tea adsorbed of the yellow pigments on the surface of the material are colored (Darabi et al., 2019). In the same vein, Oğuz et al. (2007), Mahajan et al. (2019) and Özkanoğlu et al. (2020) in their articles noted that resin-containing materials change more color in coffee, however, Omata et al' (2006) study found no superiority of tea and coffee in terms of staining, as in parallel our results (Oguz et al., 2007) (Mahajan et al., 2019) (Ozkanoglu et al., 2020) (Omata et al., 2006).

To determine the effects of milk, Ali et al (2016) compared fruit juices with strawberry milk in their study and found that strawberry milk occurred very little coloration (Ali et al., 2016). Hamouda (2011) evaluated the surface hardness and solubility of different restorative materials in fruit juice, colored carbonated beverage, milk and deionized water. He found that the fruit juice has a more solving effect than milk, this was attributed to the high pH of water and milk. They also found that the surface roughness of the materials immersed in milk is not significantly different from those in deionized water (Hamouda, 2011).

The findings of the current study are consistent with those of Manojlovic et al. (2016) who claimed that the addition of milk to tea has decreased the pH and reduces the staining potential of tea (Manojlovic et al., 2016). In an analysis discoloration of milky tea, researchers found that Milky tea and distilled water have similar coloring values. (Manojlovic et al., 2015) (Yu-Yu J et al., 2014). This result may be explained by the fact that when milk is added to the tea, polyphenols interact with milk casein. Polyphenols enable the collection of casein molecules by micelising the proline regions. Thus, the active polyphenol concentration in the solution is reduced (Zanchi et al., 2008).

In another study, the ΔE values of color perceptibility and acceptability threshold for composite resins immersed in tea and coffee were over 3 which is mean clinically significant discoloration, also discoloration decreased with the addition of milk in both solutions and reduced to a clinically acceptable level (Al Sheikh et al., 2019). This study produced results which corroborate the findings of a great deal of the previous work in this field.

The reader should bear in mind that the study is based on discoloration in vitro. In vivo studies should be done to overcome this deficiency. According to our hypothesis, when milk is added to tea and coffee drinks, polyphenols (phenolic $OH^-$ rich group in polyphenols such as theafilavin, thearubigin) chelate with milk proteins. Thus, the amount of chelated polyphenol with salivary proteins is reduced. Therefore, less coloration occurs than tea and coffee without milk. With this study, our hypothesis has been partially confirmed.

In our study, addition of milk to tea and coffee has changed the color of samples towards blue on the yellow-blue spectrum. This changes may suggest that it can be interpreted optical whiteness with the neutralization of the staining and may have increased the whiteness.

**Conclusion**

This study has shown that coffee and tea drinks, we consume daily, cause discoloration in every tested material. One of the more significant findings to emerge from this study is that adding milk to drinks in all composites reduced discoloration. The current findings add to a growing body of literature on discoloration. It is unfortunate that the study did not include oral environment. But the idea that adding milk to tea and coffee reduces discoloration, which is our hypothesis, has been accepted within the limitations of our study.

**References**

Abu-bakr NE, Han L, Okamoto A, IWAKU M 2000. Color stability of compomer after immersion in various media. Journal of Esthetic and Restorative Dentistry, 12(5): 258-263.

Al-Dharrab A 2013. Effect of energy drinks on the color stability of nanofilled composite resin. The journal of contemporary dental practice, 14: 704-711.

Ali A, Niazy M, El Malt M 2016. The Effect of Some Common Children's Drinks on Color Stability of Nanocomposite and Nanoglass Ionomer. Al-Azhar Dental Journal for Girls, 3(2): 87-92.

AlSheikh, R. 2019. Color stability of Lucirin-photo-activated resin composite after immersion in different staining solutions: a spectrophotometric study. Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry, 11: 297.

Awliya WY, Al-Alwani DJ, Gashmer ES, Al-Mandil HB 2010. The effect of commonly used types of coffee on surface microhardness and color stability of resin-based composite restorations. Saudi Dental Journal, 22: 177-181.

Bagheri R, Burrow MF, Tyas M 2005. Influence of food-simulating solutions and surface finish on susceptibility to staining of aesthetic restorative materials. Journal of dentistry, 33(5): 389-398.

Catelan A, Briso ALF, Sundfeld RH, Goiato MC, Santos PH 2011. Color stability of sealed composite resin restorative materials after ultraviolet artificial aging and immersion in staining solutions. The Journal of prosthetic dentistry, 105(4): 236-241.

Darabi F, Seyed-Monir A, Mihandoust S, Maleki D 2019. The effect of preheating of composite resin on its color stability after immersion in tea and coffee solutions: An in-vitro study. Journal of Clinical and Experimental Dentistry, 11(12): 1151.

Dietschi, D, Campanile G, Holz J, Meyer JM 1994. Comparison of the color stability of ten new-generation composites: An in vitro study. Dental Materials, 10: 353-362.

Douglas WH, Craig RG 1982. Resistance to extrinsic stains by hydrophobic composite resin systems. J Dent Res, 61: 41-43

Festuccia MS, Garcia L.da F, Cruvinel DR, PiresDe-Souza F 2012. Color stability, surface roughness and microhardness of composites submitted to mouthrinsing action. J Appl Oral Sci, 20(2): 200-205.

Hagerman AE, Butler LG 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interaction. J.Biol. Chem, 256: 4494-4497

Hamouda IM 2011. Effects of various beverages on hardness, roughness and solubility of esthetic restorative materials. J Esthetic and Restorative Dentistry, 23(5): 315-322.

Hotwani K, Thosar N, Baliga S 2014. Comparative in vitro assessment of color stability of hybrid esthetic restorative materials against various children's beverages. J Conservative Dentistry, 17(1): 70-74.

Johnson WM, Kao EC 1989. Assessments of appearance match by visual observation and clinical colorimetry. J Dent Res, 68: 819-822.

Kahramanoğlu E, Kulak ÖY 2013. Diş hekimliğinde estetik ve renk. Cumhuriyet Dent Journal, 16: 339-347.

Leite ML, Silva FS, Meireles SS, Duarte RM, Andrade AK 2014. The effect of drinks on color stability and surface roughness of nanocomposites. European Journal of Dentistry, 8: 330-336.

Lendermann U, Grogan J, Oppenheım FG 2000. Saliva and Dental Pellicle. Adv Dent Res, 14**:** 22-28.

Llena C, Fernández S, Forner L 2017. Color stability of nanohybrid resin-based composites, ormocers and compomers. Clinical Oral Investiation, 21: 1071-1077.

Mahajan RP, Shenoy VU, Sumanthini MV, Mahajan HP, Walzade PS, Mangrolia R 2019. Comparative Evaluation of the Discoloration of Microhybrid and Nanohybrid Composite Resins by Different Beverages: A Spectrophotometric Analysis. The journal of contemporary dental practice, 20(2): 226-230.

Manojlovic D, Dramićanin MD, Lezaja M, Pongprueksa P, Van Meerbeek B, Miletic V 2016. Effect of resin and photoinitiator on color, translucency and color stability of conventional and low-shrinkage model composites. Dental materials, 32(2): 183-191.

Manojlovic D, Lenhard L, Milic´evic´ B, Antonov M, Miletic V, Dramic´anin MD 2015. Evaluation of staining-dependent colour changes in resin composites using principal component analysis. Sci Rep, 5: 14638.

Mazato S, Tarumi H, Kato S, Ebisu S 1999. Water sorption and colour stability of composites containing the antibacterial monomer MDPB. J Dent, 27: 279-283.

Mundim FM, Garcia Lda F, Cruvinel DR, Lima FA, Bachmann L, Pires-de-Souza Fde C 2011. Color stability, opacity and degree of conversion of pre-heated composites. Journal of Dentistry, 39: 25-29.

Nasim I, Neelakantan P, Sujeer R, Subbarao CV 2010. Color stability of microfilled, microhybrid and nanocomposite resins—An in vitro study. Journal of Dentistry. 38: 137-142.

Oguz S, Mutluay MM, Dogan OM, Bek B 2007. Color change evaluation of denture soft lining materials in coffee and tea. Dental materials journal, 26(2): 209-216.

Omata Y, Uno S, Nakaoki Y, Tanaka T, Sano H, Yoshida S, Sidhu SK 2006. Staining of hybrid composites with coffee, oolong tea, or red wine. Dental materials journal, 25(1): 125-131.

Ozdemir F, Sahin H 2007. Importance of tea in daily life of Turkish people. Proceedings of the 3rd International conference on O-CHA(tea) culture and Science ICOS

Ozkanoglu S, Akin EG 2020. Evaluation of the effect of various beverages on the color stability and microhardness of restorative materials. Nigerian Journal of Clinical Practice, 23(3): 322.

Patel SB, Gordan VV, Barrett AA, Shen C 2004. The effect of surface finishing and storage solutions on the color stability of resin-based composites. J Am Dent Assoc, 135(5): 587-594.

Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Mirando M, Wassim J, Colombo M 2016. Color stability of esthetic restorative materials: A spectrophotometric analysis. Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica, 2: 95-101.

Proctor GB, Pramanık R, Carpenter GH, Rees GD 2005. Salivary proteins interact with dietary constituents to modulate tooth staining. J Dent Res, 84: 73-78.

Ren YF, Feng L, Serban D, Malmstrom HS 2012. Effects of common beverage colorants on color stability of dental composite resins: The utility of a thermocycling stain challenge model in vitro. Journal of Dentistry, 40: 48-56.

Santos PH, Souza FI, Guedes AP, Pavan S. 2012. Effect of postpolymerization method on the color stability of composite resins submitted to ultraviolet aging. Int J Periodontics Restorative Dent, 32: 95-100.

Wilson NH, Burke FJ, Mjor IA 1997. Reasons for placement and replacement of restorations of direct restorative materials by a selected group of practitioners in the United Kingdom. Quintessence Int. 28: 245-248.

Yap AU, Low JS, Ong LF 2000. Effect of food-stimulating liquids on surface characteristics of composite and polyacid-modified composite restoratives. Operative Dentistry, 25: 170-176.

Yap AU, Wee KE 2002. Effects of cyclic temperature changes on water sorption and solubility of composite restoratives. Operative Dentistry, 27: 147-153.

Yu-Yu J, Zhi-Min Z, Ren-Dong J, Le-Xin W. 2014. Effects of typical food additives on the absorption spectrum properties of black tea. Measurements, 49: 351-357.

Zanchi D, Narayanan T, Hagenmuller D, Baron A, Guyot S, Cabane B, et al. 2008. Tannin-assisted aggregation of natively unfolded proteins. EPL (Europhys Lett) 82: 5800.

# Ülkemizde piyasada bulunan organik besinler ve bunlara ilişkin bazı özelliklerin değerlendirilmesi

Duygu Ağagündüz[1]*, Teslime Özge Şahin[1], Birsen Yılmaz[1]

*[1]Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: duyguturkozu@gazi.edu.tr

**Özet**

Bu çalışma, Türkiye piyasasında bulunan organik besin çeşitliliğini ve bu besinlerin bazı özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Araştırmada yer alan organik besinlere dair bilgiler Ankara ili'ndeki büyük market zincirlerine gidilerek elde edilmiştir. Yapılan piyasa araştırmasında piyasada erişilebilen organik besinler (148 adet) ve bu besinlerin bazı özellikleri (logo var/yok, logonun olduğu yer, fiyat, vb.) incelenmiştir. Organik ürün logosu; incelenen ürünlerin %47.3'ünde paketin önünde, %22.3'ünde paketin üstünde, %18.2'sinde paketin yanında ve %12.2'sinde ise paketin arkasında olduğu tespit edilmiştir. Organik ürünler besin gruplarına göre incelendiğinde ise %12.2'sini süt ve ürünleri, %9.5'ini et ve ürünleri, %8.1'ini bal ve reçel, %3.4'ünü meyve ve sebze suları kalan kısmı ise diğer ürünler (bebek püreleri, taze meyveler, çaylar vb.) oluşturmaktadır. Organik olan ürünler ile organik olmayan ürünlerin fiyat karşılaştırması yapıldığında; organik olan ürünlerin fiyatlarının organik olmayanlardan daha yüksek olduğu ve fiyat farkının ürün grubuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Organik sütlerin organik olmayanlara göre fiyatı %40.0, organik peynirlerin organik olmayanlara göre fiyatı %35.0, organik yoğurtların organik olmayanlara göre fiyatı %500.0, organik tavukların organik olmayanlara göre fiyatı %300, organik yumurtaların organik olmayanlara göre fiyatı %100.0 daha yüksektir. Bu çalışmanın sonucunda; ülkemizde diğer ülkelere kıyasla organik besin seçeneğinin kısıtlı olduğu ve beslenmede önemli yer tutan temel ürün gruplarının organik çeşitlerinin organik olmayanlara kıyasla fiyatlarının %35-300 daha fazla olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Organik besin, Logo, Fiyat

**Evaluation of organic foods and and some of their properties placed in the market in our country**

**Abstract**

This study was conducted to assess the diversity of the organic food market in Turkey and some properties of these foods. Related knowledge of organic foods in the research was obtained by going to big market chains in Ankara province. In the market research, organic foods available in the market (148 pieces) and some features of these foods (with/without logo, location of the logo, price, etc.) were examined. When examining the location of the organic logo; it was determined that 47.3% of the examined products were in front of the package, 22.3% were on the package, 18.2% were next to the package and 12.2% were behind the package. When organic products were analyzed by food groups, it was determined as follows 12.2% milk and products, 9.5% meat and products, 8.1% honey and jam, 3.4% fruit and vegetable juices, and other products (baby purees, fresh fruits, teas, etc.). After the price comparison of organic and non-organic products was made; it was detected that the prices of organic products were higher than non-organic products and the price difference varied depending on the product group. The price of organic milk was 40.0%, organic cheeses were 35.0%, organic yogurts was 500.0%, organic chickens was 300%, organic eggs was 100.0% higher than non-organic ones. As a result of this study; it was found that the organic food option was limited in our country compared to other countries and the prices of organic varieties of the main product groups that had an important place in nutrition were 35-300% higher than the non-organic ones.

**Keywords:** Organic food, Logo, Price

## GİRİŞ

Artan nüfusun besin ihtiyaçlarını karşılayabilmek amacıyla bitkisel besinlerin üretiminde kimyasal tarım ilaçları ve gübre kullanımı; hayvansal besinlerde ise hormon ve antibiyotik gibi maddelerin kullanımı artmıştır. Bu uygulama tekniklerinin, zaman içerisinde ortaya çıkan insan ve çevre sağlığı üzerindeki olumsuz

etkilerinden dolayı bilinçli üreticiler ve tüketiciler organik üretim sistemleri gibi sürdürülebilir tarım uygulamalarının ortaya çıkmasına ve yaygınlaşmasına ön ayak olmuştur.

Organik; hem besine hem de üretim metoduna yönelik bir terimdir (İlter ve ark.,1996). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından oluşturulan Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC) organik tarımı "biyolojik çeşitlilik, biyolojik döngüler ve toprağın biyolojik etkinliğini içeren, agroekosistemi teşvik eden ve geliştiren bütünsel bir üretim-yönetim sistemidir" şeklinde tanımlamaktadır (CAC, 2019). Bu sistemle üretilen organik besinler; modern genetik mühendislik tekniklerinin, sentetik pestisitlerin, büyüme hormonlarının, antibiyotiklerin, kimyasal gübrelerin, katkı maddelerinin ve kimyasal ambalaj malzemelerinin kullanılmadığı bitkisel ve hayvansal besinlerdir (Anon, 2010).Organik tarım metodu dışındaki geleneksel metotlara ise konvansiyonel tarım metodu ve bu metotla üretilen besinlere ise konvansiyonel besin ismi verilmektedir (Türközü ve Karabudak, 2014).

Organik üretim sistemlerinin besin güvenliği, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri ve yanı sıra uzun vadede geleneksel üretim sistemlerine göre daha sürdürülebilir olduğu düşüncesi organik besinleri global olarak son yıllarda daha popüler bir hale getirmiştir (Türközü ve Karabudak, 2014). Ülkemizde de benzer şekilde tüketicilerin organik besinlere olan ilgisi gün geçtikçe artış göstermektedir. Artan bu talebe karşılık olarak piyasada bulunan organik ürün çeşitliliği ve bunlara ilişkin yasa-yönetmeliklerce belirlenen bazı özellikler ve kalite kriterleri önem arz etmektedir. Bu çalışma, Türkiye piyasasında bulunan organik besin çeşitliliğini ve bu besinlerin bazı özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

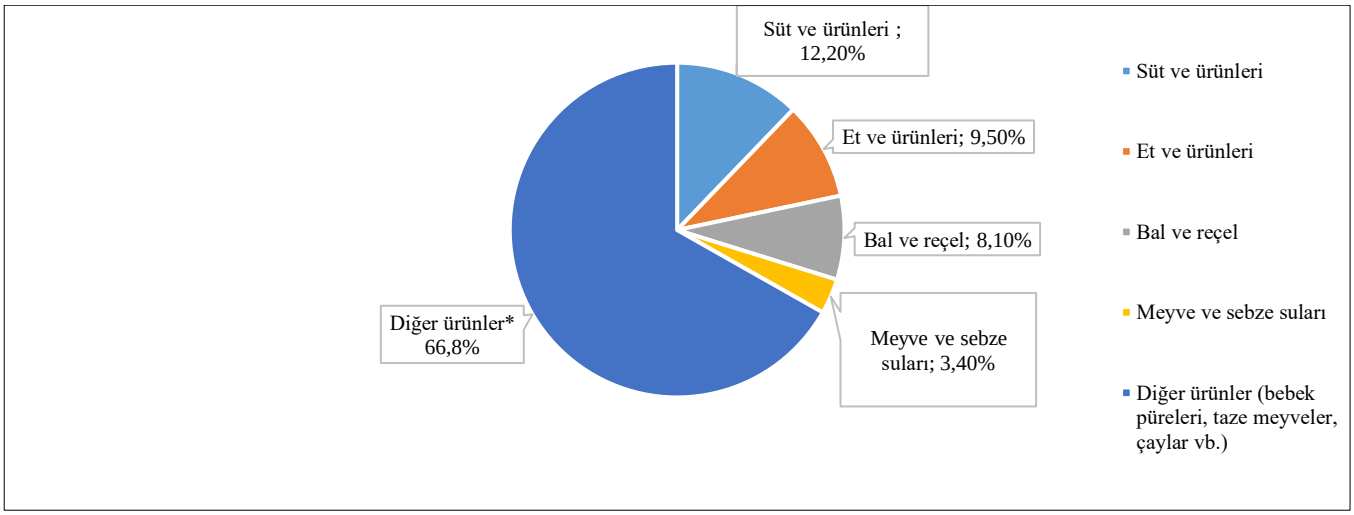
## MATERYAL VE METOT

Araştırmada yer alan organik besinlere dair bilgiler Ankara ili'ndeki büyük market zincirlerine gidilerek elde edilmiştir. Kasım 2019-Ocak 2020 arasında yapılan piyasa araştırmasında, 148 adet organik besine erişilebilmiştir.

Piyasada erişilebilen organik besinlerin bazı özellikleri (ürün grubu, logo var/yok, logonun olduğu yer, fiyat, vb.) incelenmiştir. Organik olan ve olmayan ürünlerin fiyat karşılaştırılmalarının yapılmasında; eğer mevcutsa aynı ürün grubunun/markanın organik olmayan çeşidinin fiyatı temel alınmıştır. Mevcut olmaması durumunda ise organik ürün grubuna eşdeğer kalite özelliklerine sahip olan en az beş markanın fiyatlarının ortalaması alınmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, SPSS 22.0 programı kullanılmıştır. Ölçülen değişkenler için sayı ve yüzde (%) değerleri verilmiştir.

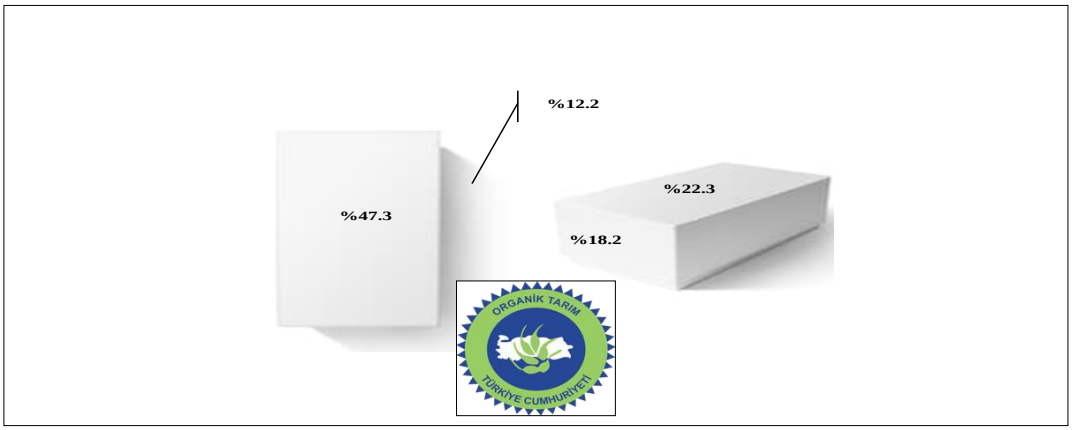
## BULGULAR

Ankara il merkezinde yapılan bu piyasa araştırması sonucunda 148 adet organik besine/ürüne erişilebilmiştir.. Ürünlerin besin gruplarına göre dağılımı incelendiğinde %12.2'sini süt ve ürünleri, %9.5'ini et ve ürünleri, %8.1'ini bal ve reçel, %3.4'ünü meyve ve sebze sularından oluştuğu görülmüştür (Şekil 1). Bu gruplara ek olarak bebek püreleri, taze meyveler ve çaylar gibi çok çeşitli çeşitli besinler bulunmaktadır. Ancak bu besinler için seçeneklerin sınırlı olmasından dolayı her birinin piyasada bulunma sıklığının %3'ten daha az olduğu saptanmıştır (Şekil 1).




**Şekil 2.** Organik ürünlerin besin gruplarına göre dağılımı

Organik tarım logosunun ürünlerin paketlerindeki konumları Şekil 2'de gösterilmiştir. Buna göre; incelenen ürünlerin %47.3'ünde logo paketin önünde, %22.3'ünde paketin üstünde, %18.2'sinde paketin yanında ve %12.2'sinde ise paketin arkasındadır (Şekil 2).




**Şekil 3.**Organik tarım logosunun bulunduğu yerlerin dağılımı

Piyasada bulunan organik ürünler ile organik olmayan ürünlerın fiyatları karşılaştırıldığında, organik ürün seçeneklerinin fiyatlarının %35-%500 arasında daha fazla olduğu ve bu fiyat farkının ürün grubuna göre değiştiği görülmüştür. Organik sütlerin fiyatı organik olmayanlardan %40.0 fazla bulunurken, bu oran organik yoğurtlarda %500.0, organik tavuklarda %300, organik yumurtalarda %100.0, organik peynirlerde %35.0 olarak hesaplanmıştır.

## TARTIŞMA

Ülkemizde organik besin çeşitliğinin ve özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmada, piyasada organik ürün çeşitliğinin kısmen kısıtlı olduğu saptanmıştır. TC. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yayınlanan organik ürün istatistiklerinde (2017-2018) ülkemizde bulunan organik besin çeşitliliği listelenmiştir. Buna göre; organik yumurtalar, organik bebek mamaları, organik sütler, organik unlar ve unlu mamuller, organik baharatlar, organik çaylar, organik kuru meyveler ve meyve suları, organik zeytinler/zeytinyağları, organik kuruyemişler Türkiye piyasasında bulunan bazı organik ürünlerdendir (Anon, 2018). Bu çalışma, tüketiciler tarafından Ankara piyasasında bulunan marketlerden 148 adet besinin erişilebildiğine ve en çok erişilebilen ürün gruplarına ışık tutmuştur.

Bu çalışmada piyasadan erişilebilen organik besinlerin tümünde 2004 yılında yayınlanan 5262 sayılı "Organik Tarım Kanunu" na dayalı olarak (Anon, 2004) Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik çerçevesinde (Anon, 2010) kullanımı zorunlu tutulan organik tarım logosunun kullanıldığı ve ürün gruplarına göre logonun konumlarının değişebildiği desteklenmiştir.
Bu çalışmada diğer önemli bir bulgu olarak organik ürünlerin organik olmayanlarına kıyasla fiyatlarının daha yüksek olduğu ve fiyat farkının ürün grubuna göre değiştiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sıklıkla tüketicilerin birçok motivasyon unsuruyla organik besinleri satın aldıklarını, daha çok para ödemeye istekli olduklarını ortaya koymaktadır (Kristina ve ark., 2017; Rana ve Paul, 2017).Organik besinlere yönelik tüketici davranışındaki değişimi etkileyen faktörlerin araştırıldığı bir çalışmada, sağlık bilincine sahip tüketicilerin, geleneksel üretim sistemi ile yetiştirilen besinlere göre organik besinleri daha çok tercih ettiği belirtilmiştir. Tüketicilerin bu tutumu, kalp-damar hastalıkları ve depresyon gibi yaşam tarzı kaynaklı hastalıkların artan insidansından büyük ölçüde etkilenmektedir (Rana ve Paul, 2017). Başka bir çalışmada, organik besinlerin daha sağlıklı ve lezzetli olduğu algısının tüketicileri organik besinlere daha çok para ödemeye olan isteklerinin ana belirleyicileri olduğu ve aylık gelir arttıkça bu isteğin daha da arttığı saptanmıştır (Kristina ve ark., 2017). Buna ek olarak bir çalışmada da, genç tüketicilerin organik olarak yetiştirilen besinlere karşı daha olumlu tutumları olduğu, ancak daha yaşlı tüketicilerin ise organik ürün alıcısı olma olasılığı daha yüksek olduğu bulunmuştur (Magnusson ve ark., 2001). Hill ve Lynchehaun (2002), ailelerin genellikle çocuk sahibi olduklarında organik besinlere yöneldiğini rapor etmiştir (Hill ve Lynchehaun, 2002). Özetle; organik besinleri satın alan tüketici profilleri çeşitlilik göstermekle birlikte bu araştırma ülkemizde organik besinlerin satın alınmasında önemli bir maliyet bariyerinin olabileceğini ortaya koymaktadır.

## SONUÇ

Bu çalışmanın sonucunda; ülkemizde diğer ülkelere kıyasla organik besin seçeneğinin kısıtlı olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda organik besinlere olan talebin artmasına paralel olarak zaman içerisinde piyasada bulunan organik ürün çeşitliliğinin daha da arttıracağı düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada, beslenmede önemli yer tutan temel ürün gruplarının organik çeşitlerinin organik olmayanlara kıyasla fiyatlarının %35-300 daha fazla olduğu saptanmıştır. Organik besinlere olan arz-talep hususu maliyet/fiyat açısından önemli bir belirleyici olmakla birlikte bu çalışma tüketicilerin organik besinlere erişiminde önemli bir maliyet engelinin olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

## KAYNAKLAR

Anon. 2004. Türk Gıda Kodeksi. Organik Tarım Kanunu. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 3 Aralık 2004 tarihli ve 25659 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anon. 2010. Türk Gıda Kodeksi. Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 18.08.2010 tarihli ve 27676 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anon. 2018. Organik Tarım İstatistikleri. Erişim: https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Bitkisel-Uretim/Organik-Tarim/Istatistikler Erişim Tarihi: 12.04.2020.

Codex Alimentarius Commission (CAC) International Food Standards. Officıal Standards/Official Codex standards/List/CAC/GL 32.

Hill H, Lynchehaun F 2002. Organic milk: attitudes and consumption patterns. British Food Journal,104: 526–542.

Kristina Petljak, Ivana Štulec, Sanda Renko. 2017. Consumers` willingness to pay more for organic food in Croatia. Ekonomski Vjesnik, 441-455.

Magnusson MK, Arvola A, Koivisto Hursti, UK, Åberg L, Sjödén PO 2001. Attitudes towards organic foods among Swedish consumers. British Food Journal, 103: 209-227.

Rana J, Paul J 2017. Consumer behavior and purchase intention for organic food: A review and research agenda. Journal of Retailing and Consumer Services, 38: 157-165.

Türközü D, Karabudak E. 2010. Organik gıdaların besin değeri, gıda güvenliği ve lezzet açısından değerlendirilmesi. GIDA, 39(2): 119-126.

# Effect of different mouthwashes on the surface properties of composite resins used for aesthetic purposes

Begüm Erpaçal [1], Ezgi Sonkaya [2*], Suzan Cangül[3], Faruk Öztekin[4]

[1]University of Dicle, Faculty of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Diyarbakır, Turkey
[*2] University of Çukurova, Faculty of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Adana, Turkey
[3] University of Dicle, Faculty of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Diyarbakır, Turkey
[4] University of Fırat, Faculty of Dentistry, Department of Endodontics, Elazığ, Turkey

*sonkayaezgi@yahoo.com

## Abstract

**Aim:** The aim of this study is to evaluate the effect of two different mouthwashes on the color change and surface roughness of anterior composite resins. **Material-Methods:** 90 cylindrical discs were prepared in 2 mm deep, 6 mm in diameter, 30 of each composite group. Asteria, Ceram X Duo and Beautifil placing on standard sized discs were polymerized with LED. Samples were kept in 37 ℃ distilled water for 24h. The samples were dried and the first color measurements were made by Vita Easy shade. Average CIE L * a * b * values were calculated after 3 times for each sample. First surface roughness values were recorded with the Profilometer. Mean values were recorded in Ra after repeated 5 times. Then, each composite group was divided into 3 subgroups. The first groups were submerged in distilled water, second groups in Listerine Tooth Defense and third groups in Meridol for 24h. At the end of this period, the last color and roughening measurements were made. Kruskal Wallis ANOVA and Mann Whitney U tests were used for statistical analysis. **Results:** When the results were examined, it was observed that the surface roughness occurred in the samples kept in Listerin and this was statistically significant and this rate decreased in Meridol and distilled water. The highest roughness occurred in the Beautifil composite held in Listerin and the least roughness occurred in the samples of the same composite, which were kept in distilled water. İt was determined that the most coloring solution was Meridol, and the most colored composite was Beautifil. C**onclusion:** In this study, it was concluded that different mouthwashes were effective color change and roughness of composites, but should be supported by new research.

**Key Words:** Coloration, surface roughness, anterior composite, mouthwashe

## Introduction

In recent years, with the increase of aesthetic expectations of patients, various materials have been started to be produced for clinical use (ElEmbaby, 2014). In addition to this, restorative material compositions have been significantly improved. Composite resins are highly popular restorative materials used for aesthetic purposes with their well-developed properties. Also, their ability to resemble natural tooth structures increases the demand for these materials day by day (Fontes et al., 2009). The positive features expected from these materials are high abrasion and adhesion resistance, great aesthetics with low surface roughness, water absorption and solubility in the water so they contribute to improve the integrity of the tooth and restoration interface.

Color harmony in dentistry is one of the most important concepts for providing aesthetics. To maintain the harmony, intrinsic and extrinsic factors that cause coloration of composite resins should be known. Internal factors include that water absorption in the resin matrix, some methacrylate groups not reacting, oxidation of amine accelerators or polymer matrix. On the grounds that the internal pigmentation is irreversible, the restoration needs to be renewed. Unlike internal coloring, external coloring can be easily removed from the restoration surface (Bagheri et al., 2005) (Barutcigil et al., 2012).

One of the most important factors in providing aesthetics is about surface roughness. On account of plaque retention, irregularities on the surface facilitate caries, gingival inflammation and surface discoloration (Yıldırım et al., 2012). The surface roughness of composite resins are affected by some factors, for instance, monomer type, filler shape and size, and depth of polymerization. Reducing the inorganic particle size and increasing the amount of organic filler contributes to reducing roughness (Celik et al., 2017).

The contact of liquids with high acidic and chemical contents with composite resins increases the surface roughness. Especially mouthwashes destroy the surface of resins due to their high chemical content (Colucci et al., 2009). This increases the likelihood of coloration and surface roughening of the composite resin. There

is a consensus among scientists that long-term use of mouthwashes may cause surface changes in tooth enamel too (Favaro et al., 2020).

This study aims to evaluate the effect of different mouthwashes on the coloration and surface roughness of composite resins used for aesthetic purposes.

**Materials and Methods**

In this study, the effect of two different types of mouthwash on the surface roughness and color stability of aesthetic composite resins was evaluated. Composite resins were selected in the same colors as A2. Their compositions and manufacturer companies are shown in Table 1. 90 cylindrical discs, 2 mm deep-6 mm in diameter were prepared. Subsequently, 90 samples randomly were divided into 3 groups, 30 of which were each. Estelite Asteria (EA), Ceram X Duo(CX), and Beautifil (B) were placed on discs prepared in standard sizes with the help of a mouth spatula and then the pressure was applied with transparent tape and glass coverslips to have a smooth surface. Then, all samples were polymerized using light emitting diode (Woodpecker LED-B Curing Light, Guangxi, China) source according to the manufacturer's instructions.

**Table 1.** Compounds of composite resins and manufacturers

| Composite Resins | Manufacturer Companies | Compositions |
|---|---|---|
| Estelite Asteria (EA) | Tokuyama Dental Corporation, Tokyo, Japan | Filler: 82 wt% Supra-Nano Spherical Filler (200 nm SiO2-ZrO2), composite filler (include 200 nm spherical SiO2-ZrO2) Base resin: Bis-GMA,Bis-MPEPP,TEGDMA,UDMA |
| Ceram X Duo (CX) | Dentsply, Konstanz, Germany | Methacrylate modified polysiloxane, Ba, Al Borosilicate glass |
| Beautifil (B) | Shofu, Kyoto City, Kyoto Prefecture, Japan | Bisphenol A glycidyl dimethacrylate, TEGDMA, inorganic glass filler, aluminuoxide, silica, pre-reacted glass ionomer filler, DL-camphorquinone |

Following this process, the samples whose polishing was completed with the help of sof-lex discs (3M ESPE, St. Paul, MN, USA). They were submerged in 37 °C distilled water for 24h. Samples pulled out from the water after 24h were completely dried and the first color measurements were made using the Vita Easy Shade (Easyshade Advance; Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Germany). Color measurements were made on a white background and under D65 standard lighting conditions with a device that calibrated before each measurement. Every sample was measured three times. Then average CIE L * a * b * values was calculated. After color measurements, the first surface roughness values of all samples were recorded with the profilometer device (Surtronic 25, Taylor Hobson, Leicester, UK). The measurements were made five times from each sample. The mean values were recorded in Ra.

After all, each composite group was divided into three subgroups with having ten samples each. The first groups in distilled water (W), the second groups in Listerine Tooth Defense (L), and the third groups in Meridol (M) mouthwash for 24 hours were submerged. At the end of this period, after the samples were washed with distilled water for 10 second. Second color and roughening measurements were made following the same procedure used earlier. In the calculation of color differences between measurements, the formula below has been use;

$$\Delta E^* = ((L_1^* - L_0^*)^2 + (a_1^* - a_0^*)^2 + (b_1^* - b_0^*)^2]^{1/2}.$$

In the formula, values with indexes of 0 and 1 respectively represent the initial measurements and measurements formed after holding the experiment. Kruskal Wallis ANOVA and Mann Whitney U tests were used for statistical evaluation of the data.

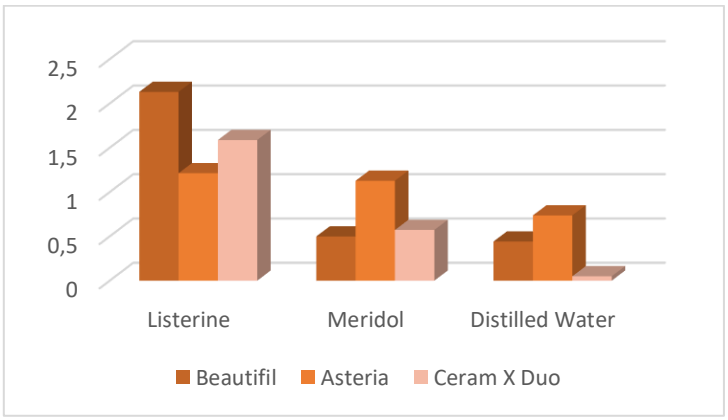
**Results**

When the data achieved at the end of 24 hours were examined, it was seen that there was a statistically significant surface roughness in all composite samples in the L, while this proportion decreased in M and W. According to mean values, the roughest surface was B composite submerged in L, the least is on CX (Table 2) (Graphic 1).

**Table 2.** Surface roughness averages of composite resins submerged in mouthwashes for 24h

| Surface Roughness | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Kruskal Wallis ve Mann Whitney U |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| **Beautifil (Distilled Water)** | 10 | ,4415 | ,04953 | ,01566 | ,4061 | ,4769 | **Chi-Square=22,261 P=0,001 There is a statistical difference between group means.** |
| **Beautifil (Listerine)** | 10 | 2,1299 | ,34223 | ,10822 | 1,8851 | 2,3747 | |
| **Beautifil (Meridol)** | 10 | ,4987 | ,05428 | ,01716 | ,4599 | ,5375 | |
| **Total** | 30 | 1,0234 | ,81970 | ,14966 | ,7173 | 1,3294 | |
| **Asteria (Distilled Water)** | 10 | ,7365 | ,04756 | ,01504 | ,7025 | ,7705 | **Chi-Square =19,652 P=0,001 There is a statistical difference between group means.** |
| **Asteria (Listerine)** | 10 | 1,2125 | ,20361 | ,06439 | 1,0668 | 1,3582 | |
| **Asteria (Meridol)** | 10 | 1,1274 | ,13136 | ,04154 | 1,0334 | 1,2214 | |
| **Total** | 30 | 1,0255 | ,25172 | ,04596 | ,9315 | 1,1195 | |
| **Ceram X Duo (Distilled Water)** | 10 | ,0498 | ,01921 | ,00607 | ,0361 | ,0635 | **Chi-Square =25,806 P=0,001 There is a statistical difference between group means.** |
| **Ceram X Duo (Listerine)** | 10 | 1,5871 | ,29331 | ,09275 | 1,3773 | 1,7969 | |
| **Ceram X Duo (Meridol)** | 10 | ,5725 | ,09079 | ,02871 | ,5076 | ,6374 | |
| **Total** | 30 | ,7365 | ,67137 | ,12258 | ,4858 | ,9872 | |

**Graphic 1.** Surface roughness averages of composite resins submerged in mouthwashes for 24h

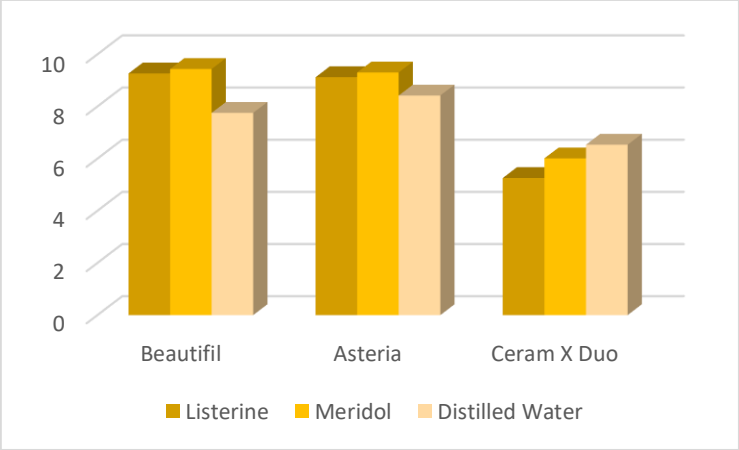



When the discoloration had examined on the composite resins in the mouthwashes at the end of the same period, it was determined the most coloring solution was M and the most colored composite was B. As well as the least colored composite was found as CX for each solution (Table 3) (Graphic 2).

**Table 3.** Discoloration averages of composite resins submerged in mouthwashes for 24h

| Discoloration | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Kruskal Wallis ve Mann Whitney U |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| **Beautifil (Distilled Water)** | 10 | 7,7567 | 1,47555 | ,46661 | 6,7011 | 8,8122 | **Chi_Square=6,970 P=0,03 There is a statistical difference between group means.** |
| **Beautifil (Listerine)** | 10 | 9,2658 | 1,44731 | ,45768 | 8,2304 | 10,3011 | |
| **Beautifil (Meridol)** | 10 | 9,4367 | 1,16633 | ,36883 | 8,6023 | 10,2710 | |
| **Total** | 30 | 8,8197 | 1,52888 | ,27913 | 8,2488 | 9,3906 | |
| **Asteria (Distilled Water)** | 10 | 8,4214 | ,76518 | ,24197 | 7,8740 | 8,9688 | **Chi_Square=3,014 P=0,03 There is no statistical difference between group means.** |
| **Asteria (Listerine)** | 10 | 9,1229 | 1,00385 | ,31745 | 8,4048 | 9,8410 | |
| **Asteria (Meridol)** | 10 | 9,3039 | 1,96486 | ,62134 | 7,8983 | 10,7094 | |
| **Total** | 30 | 8,9494 | 1,35736 | ,24782 | 8,4425 | 9,4562 | |
| **Ceram X Duo (Distilled Water)** | 10 | 6,5339 | 1,34941 | ,42672 | 5,5686 | 7,4992 | **Chi_Square=6,088 P=0,05 There is a statistical difference between group means.** |
| **Ceram X Duo (Listerine)** | 10 | 5,2575 | ,88607 | ,28020 | 4,6237 | 5,8914 | |
| **Ceram X Duo (Meridol)** | 10 | 6,0104 | 1,52874 | ,48343 | 4,9168 | 7,1040 | |
| **Total** | 30 | 5,9339 | 1,34831 | ,24617 | 5,4305 | 6,4374 | |

**Graphic 2.** Average discoloration of composite resins submerged in mouthwashes for 24h




With this study, it was concluded that there was no direct correlation between discoloration and surface roughness.

**Discussion**

Various factors cause a change of surface properties of restorative materials. The main ones are coloring agents, differences in the structure of the materials, , changes in pH and oral cavity. (Güler et al., 2013). Mouthwashes, especially having antibacterial activity, increase coloration and roughness in these materials due to their chemical content. (Lepri et al., 2014) (Bagis et al., 2011). In this study, the effect of mouthwashes on the surface properties of composite resins was researched.

The results of Lee et al.'s study indicate that mouthwashes investigated the effect of restorative materials on color change, it was observed that L mouthwash causes coloring, although it is not disthinguishable by eye. Thus, many factors such as low pH, alcohol content, emulsifiers, organic acids, and structural properties had been identified to play a role in this coloring (Lee et al., 2000).

Because of the low pH and high alcohol content of L, it affects the physical, mechanical and biological properties of composite resins (ElEmbaby, 2014). Especially it leads to softening in the structure of the material, hence it causes biological degradation and so the polymer matrix collapse (Villalta et al., 2006). In

the studies of Öngöl et al., where they examined the effect of six different types of mouthwash on the coloring of composite resins, it was stated that all types had been used created significant color differences after 24 hours. This coloring occured more in the samples that submerged in L and Chlorhexidine (Ongül et al., 2012). However in our study, the mouthwash that caused the highest discoloration was found as M after 24 hours.

When the previous studies were examined, it was seen that the pigmentation depends on immersion duration of samples in solutions (Kumari et al., 2015) (Tekçe et al., 2015). Studies have shown the color change that may occur on samples which are artifically immersed 24 hours can be observed on a vital teeth at least after a month. The four-week immersion period equals to 2.5 years in oral atmosphere (Bezgin et al., 2015). For these reasons, a 24-hour exposure time was preferred in this study.

Değirmenci et al. in a study which evaluates the effects of mouthwashes on the microhardness and color change of composites in gingival color, mouthwash trade name and time cause statistically significant differences on the dependent variables. The highest ΔE values in the Listerine Cool Mint group and the lowest values in W were observed (Degirmenci and Degirmenci, 2018). In the studies of Çelik et al., which examined the effects of three different mouthwash on four different composite resins, they found that there was a significant difference between all samples.(Celik C et al., 2008).

In a study conducted in 2020, it was concluded that microhybrid and nanohybrid composites were shown similarly quantity discoloration. In addition to this, the discoloration values of CX were found to be lower compared to other composite resins (Alkhadim, Y. K., et al 2020). Different studies also support that CX has high color stability. (Llena et al, 2017) (Gregor at al, 2016). CX is phrased an ‘ormoser’ containing polysiloxane, polyurethane methacrylate, and Bis-EMA. Bis-EMA causes less water absorption due to its low hydrophilicity and increases the color stability of the material (Venz and Dickens, 1991) (Kerby et al, 2009) (Gregor at al, 2016). As a result of this study, the lowest coloration values were found in Ceram X Duo. These results match those observed in earlier studies.

Trauth et al. evaluated the effect of mouthwashes and toothpaste on the surface roughness of composite resins. As a result of their research, they stated that only one kind of mouthwash affects the surface roughness, while others do not cause significant changes (Trauth KG et al., 2012). Sadaghiani et al. reported that mouthwashes increase the surface roughness, although its not significant (Sadaghiani L et al., 2007). In our study, it was seen that L changed the surface roughness statistically significantly. In another study, it was reported that more research is needed in order to examine the long-term effects of these mouthwashes, which are sold without a prescription and are preferred by patients (Barutcugil C et al., 2014).

**Conclucion**

In summary, these results show that the use of mouthwashes affects the surface properties of composite resins such as roughness and coloration, but due to the limited number of studies, this issue should be supported by new studies.

**References**

Alkhadim YK, Hulbah MJ, Nassar HM 2020. Color shift, color stability, and post-polishing surface roughness of esthetic resin composites. Materials, 13(6): 1376.

Bagheri R, Burrow MF, Tyas M 2005. Influence of foodsimulating solutions and surface finish on susceptibility to staining of aesthetic restorative materials. J Dent, 33: 389-398.

Bagis B, Baltacioglu E, Ozcan M, Ustaomer S 2011. Evaluation of chlorhexidine gluconate mouthrinse-induced staining using a digital colourimeter: an in vivo study. Quintessence Int, 42(3):213-223.

Barutcugil Ç, Kürklü D, Barutcugil K, Harorlı O 2014. Beyazlatıcı ağız gargaralarının kompozit rezinin yüzey pürüzlülüğü üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 24.1: 33-38.

Barutcigil Ç, Harorlı OT, Seven N. 2012. Bazı geleneksel içeceklerin mikrohibrit kompozit rezinde meydana getirdiği renk değişikliklerinin incelenmesi. Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. 22(2): 114-119.

Bezgin T, Özer L, Tulga Öz F, Özkan P 2015. Effect of toothbrushing on color changes of esthetic restorative materials. J Esthet Restor Dent 27 Suppl 1: 65-73.

Colucci V, Dos Santos CD, Do Amaral FL, Corona SA, Catirse AB 2009. Influence of NaHCO3 powder on translucency of microfilled composite resin immersed in different mouthrinses. J Esthet Restor Dent, 21: 242-248.

Celik C, Yuzugullu B, Erkut S, Yamanel K 2008. Effects of mouth rinses on color stability of resin composites. European journal of dentistry, 2(4): 247-253.

Celik N, Sagsoz O, Gundogdu M 2017. Farklı içeceklerin posterior kompozitlerin renk değişikliği ve yüzey pürüzlülüğü üzerine etkisinin değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 27(1); 27-33.

Degirmenci A, Degirmenci BÜ 2018. Gargaraların diş eti rengindeki kompozitlerin mikrosertliği ve renk değişimi üzerine etkileri. Uluslararası Diş Hekimliği Bilimleri Dergisi, 2; 100-107.

ElEmbaby AES 2014. The Effects of Mouth Rinses on the Color Stability of Resin-Based Restorative Materials. Journal of Esthetic and Restorative Dentistry, 26(4): 264-271.

Fontes ST, Favaro J C, Ribeiro E, Guiraldo R D, Lopes M B, Aranha AM, Berger SB 2020. Effect of mouth rinses on tooth enamel surface. Journal of Oral Science, 62(1); 103-106.

Fernandez M R, de Moura C M, Meireles S S. 2009. Color stability of a nanofill composite: effect of different immersion media. J Appl Oral Sci 17: 388-391.

Gregor L, Krejci I, Di Bella E, Feilzer AJ, Ardu S 2016. Silorane, ormocer, methacrylate and compomer long-term staining susceptibility using ΔE and ΔE 00 colour-difference formulas. Odontology, *104*(3); 305-309.

Güler E, Gönülol N, Yücel AÇ, Yılmaz F, Ersöz E 2013. Farklı İçeceklerde Bekletilen Kompozit Rezinlerin Renk Stabilitelerinin Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 23(1): 24-29.

Kerby RE, Knobloch LA, Schricker S, Gregg B 2009. Synthesis and evaluation of modified urethane dimethacrylate resins with reduced water sorption and solubility. Dent Mater, *25*; 302-313.

Kumari RV, Nagaraj H, Siddaraju K, Poluri RK 2015. Evaluation of the effect of surface polishing, oral beverages and food colorants on color stability and surface roughness of nanocomposite resins. J Int Oral Health, 7(7): 63-70.

Lee Y, El Zawahry M, Noaman K, Powers J 2000. Effect of mouthwash and accelerated aging on the colour stability of aesthetic restorative materials. Am J Dent, 13(3):159-161.

Lepri CP, Ribeiro M, Dibb A, Palma-Dibb RG 2014. Influence of mounthrinse solutions on the colour stability and microhard-ness of a composite resin. Int J Esthet Dent, 9: 236-244.

Llena C, Fernández S, Forner L 2017. Color stability of nanohybrid resin-based composites, ormocers and compomers. Clinical oral investigations, 21(4); 1071-1077.

Sadaghiani L, Wilson MA, Wilson NH 2007. Effect of selected mouthwashes on the surface roughness of resin modified glass-ionomer restorative materials. Dent Mater, 23: 325-334.

Tekçe N, Tuncer S, Demirci M, Serim ME, Baydemir C 2015. The effect of different drinks on the color stability of different restorative materials after one month. Restor Dent Endod, 40(4): 255-261.

Trauth KG, Godoi AP, Colucci V, Corona SA, Catirse AB 2012. The influence of mouthrinses and simulated toothbrushing on the surface roughness of a nanofilled composite resin. Braz Oral Res, 26: 209-214.

Ongül D, Mim A, Şahin H, Değer S. 2012. Ağız gargaralarının restoratif materyallerin renk stabilitesine olan etkisi. Journal of ıstanbul university faculty of dentistry 46(2); 13-20.

Venz S, Dickens B 1991. NIR-spectroscopic investigation of water sorption characteristics of dental resins and composites. J. Biomed. Mater. Res, 25; 1231-1248.

Villalta P, Lu H, Okte Z, Garcia-Godoy F, Powers JM 2006. Effects of staining and bleaching on colour change of dental composite resins. J Prosthet Dent, 95(2): 137-142.

Yıldırım M, Patır A, Seymen F, Gençay K 2012. Estetik restoratif materyallerin cila işlemlerinden sonra yüzey yapısının SEM ile incelenmesi. Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg, 22: 277-286.

# Zebra balığı embriyosunda yapay aydınlatmanın melatonin ekspresyonuna etkileri

Ünsal Veli Üstündağ[1*], İsmail Ünal[2], Derya Cansız[3], Ebru Emekli-Alturfan[2]

[*1]Istanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, Istanbul, Türkiye
[2] Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri ABD, Istanbul, Türkiye
[3]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Biyokimya ABD, Istanbul, Türkiye

uvustundag@gmail.com

## Özet

Sirkadiyen ritm, insan metabolizmasında gün içindeki biyolojik ritmik aktivitelerini tanımlar. Dış faktörlerin canlı biyolojik ritminde önemli değişimlere neden olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Son yıllardaki yapılan araştırmalar yapay ışık kaynaklarındaki farklı ışık spektrumlarının halk sağlığını etkilediğini göstermektedir. Yapay ışık kaynaklarının sirkadiyen ritmi etkileyerek, canlıları çeşitli metabolik hastalıklara duyarlı hale getirmesi muhtemeldir. Melatonin, triptofan amino asidinden seratonin N-acetyltransferaz (arilalkilamin N-asetiltransferaz, AANAT) enziminin etkisi ile sentezlenir. Zebra balıklarında AANAT enzimini eksprese eden *aanat1* ve *aanat2* olmak üzere iki gen tanımlanmıştır. *aanat1* geni retinaya lokalize, ışığa bağımlı melatonin sentezinden sorumludur. *aanat2* geni, esas olarak pineal bezde eksprese edilir. Melatonin sentezinde bir ara bileşik olan serotonin AANAT tarafından asetillendiğinde asetil seratonin, metillendiğinde ise melatonin sentezlenmiş olur. Melatonin reseptörü *zMel1a2,* insanlarda MTNR1A (MT1) reseptörünün gen homologlarından biridir. Çalışmamızda model organizma olarak kullanılan zebra balığı embriyolarının farklı ışık spektrumu koşullarına maruziyet durumunda, melatonin reseptörü *zMel1a2* ekspresiyonuna etkileri belirlenmiştir. Bulgularımız melatonin reseptörü *zMel1a2*'nin ekspresyonunun yapay ışık kaynaklarına maruziyet durumunda dalga boylarına bağlı olarak farklı yönde etkilendiğini göstermektedir.
**Anahtar Kelimeler:** Sirkadiyen ritm, Yapay ışık kaynakları, Melatonin, Zebra balığı embriyosu

## The effects of artificial illumination on melatonin expression in Zebrafish embryo

## Abstract

The circadian rhythm defines the biological rhythmic activities of the day in human metabolism. It has long been known that external factors cause significant changes in the biological rhythm. Research in recent years shows that different light spectrum in artificial light sources affect public health. By affecting the circadian rhythm of artificial light sources, it can make living things susceptible to various metabolic diseases. Melatonin is synthesized from the tryptophan by the action of the enzyme seratonin N-acetyltransferase (arylalkylamine N-acetyltransferase, AANAT). Two genes, *aanat1* and *aanat2,* which express the AANAT enzyme, have been identified in zebrafish. The *aanat1* gene is localized to the retina and is responsible for the synthesis of light-dependent melatonin. The *aanat2* gene is mainly expressed in the pineal gland. Serotonin, an intermediate compound in melatonin synthesis, is acetylated by AANAT, acetyl seratonin is synthesized, and when methylated, melatonin is synthesized. Melatonin receptor zMel1a2 is one of the gene homologs of the MTNR1A (MT1) receptor in humans. In our study, the effects of different light spectrum conditions were determined to melatonin receptor *zMel1a2* expression in zebrafish embryos. Our findings show that the expression of melatonin receptor *zMel1a2* is affected in different directions depending on the wavelengths in case of exposure to artificial light sources.

**Keywords:** Circadian rhythm, Artificial light sources, Melatonin, Zebrafish embryo

## GİRİŞ

Gün ışığı, biyolojik saatin korunmasında ve tüm canlı organizmalarda sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli bir faktördür. Güneş ışığından kaynaklanan günlük ışık canlıların sirkadiyen ritimlerinin oluşmasını sağlar. Sirkadiyen ritm, organizmanın metabolizmasını, gündüz / gece döngüsündeki günlük dalgalanmaların yarattığı değişikliklere adapte olmasını sağlar. Bu nedenle, kardiyovasküler fonksiyon, termoregülasyon ve

glukoz metabolizması gibi birçok fizyolojik parametrede günlük sirkadiyen salınımlar tanımlanmıştır (Rutter ve ark, 2002).

Yapay ışık kaynakları, LED'ler insan sağlığı üzerindeki zararlı etkili dalga boyunda ışık yayarlar. Buna göre, son yıllarda yapay aydınlatmanın sağlık açısından zararlı etkileri olduğu kabul edilmiştir. Yapay ışığa maruz kalma diyabet, farklı kanser türleri ve depresyonla ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar yapay ışığa maruz kalmanın hücre farklılaşmasını, büyümesini ve gelişimini etkilediğini ve farklı kanser türleri, metabolik ve nörolojik hastalıklar ile ilişikili olabileceğini göstermiştir (Kumar ve ark, 2019).

Zebra balıkları sirkadiyen sistemin insan fizyolojisindeki rolünü anlamak için yapılan araştırmalarda uygun bir omurgalı hayvan modeli olarak değerlendirilir. Sirkadiyen genler ve sirkadiyen saatin genel mekanizmalar filogenetik olarak korunmuştur ancak buna ve rağmen, gündüz / gece sirkadiyen fazları ile organizmanın fizyolojik veya davranışsal durumu arasındaki fonksiyonel ilişki diurnal (gündüz aktivite gösteren) ve nokturnal (gece aktivite gösteren) türler arasında farklılık gösterir. Örneğin, memelinin ana saatinin, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinin (SCN) nöronal aktivitesi, hem diurnal hem de noktürnal türlerde gün boyunca yüksektir. Bununla birlikte, sirkadiyen sistemin ana hormonu olan melatoninin sadece gece salgılanması, noktürnal türlerinde aktif davranışsal ve fizyolojik faza denk gelirken, insanlar da dahil olmak üzere diurnal türler ise melatoninin zirvede olduğu dönemde uyku veya dinlenme halindedir. Buna göre, melatonin dahil sirkadiyen faktörler diurnal ve nokturnal hayvanlarda belirgin olarak farklı etkilere sahip olabilmektedir. Buna örnek olarak melatoninin diurnal omurgalılarda uykuyu artırması verilebilir (Shang ve Zhdanova, 2007).

Zebra balıklarının sirkadiyen ritm ile ilgili çalışmalar için sağladığı diğer önemli avantaj, saat mekanizmalarının embriyogenezde erken dönemde aktif olmaları ve bazı sirkadiyen gen ekspresyonunlarının (per-3 gibi) kalıtsal faktörlerin kontrolü altında olmasıdır. Zebra balıklarında, temel sirkadiyen hormon olan melatonin ve reseptörleri döllenme sonrası ilk günün sonunda işlevseldir. Tanımlanan altı zebra balığı melatonin reseptörü, memelilerde, amfibilerde veya kuşlarda bulunanlarla homologdur. Bunlar: zMel1a-1, zMel1a-2 ve zMel1a-3 (diğer türlerde Mel1a veya MT1'e karşılık gelir), zMel1b-1 ve zMel1b-2 (Mellb veya MT2'ye karşılık gelir) ile zMel1c (Mellc) dir (Reppert ve ark, 1995).

## MATERYAL ve METOT

Yabani tip AB/AB suşu yetişkin zebra balıkları, akvaryum sisteminde (Zebtec, Tecniplast, İtalya) 14/10 saatlik aydınlık / karanlık döngüsü altında 27 ± 1 ° C'de tutulmuştur. Çalışmamızda yetişkin zebra balıklarından elde ettiğimiz toplamda 480 adet zebra balığı embriyosu kullanılmıştır. Gruplardaki embriyolar kontrol grubunda 3200 Kelvin normal ışığa maruz bırakılmıştır. Diğer gruplar sırasıyla Mavi (455-475 nm), Yeşil (515-535 nm) Amber (585-595 nm) Derin Kırmızı (650-670 nm), Beyaz (7500 Kelvin) LED ışıklara 72 saat boyunca maruz bırakılmıştır (0,5 Watt Gücünde). Embriyolar E3 embriyo ortamında 28 $^{0}$C'de etüvde muhafaza edilmiştir.10 saat karanlık 14 saat aydınlık periyotta tutulan zebra balıklarının ışık maruziyetleri 14 saatlik süreç boyunca gerçekleştirilmiştir. LED aydınlatma kaynaklarının spektrum aralıkları, kelvin değerleri Sekonic C-700R SpectroMaster (Tokyo, Japonya) spektrometre ile teyid edilmiştir.

### RNA İzolasyonu

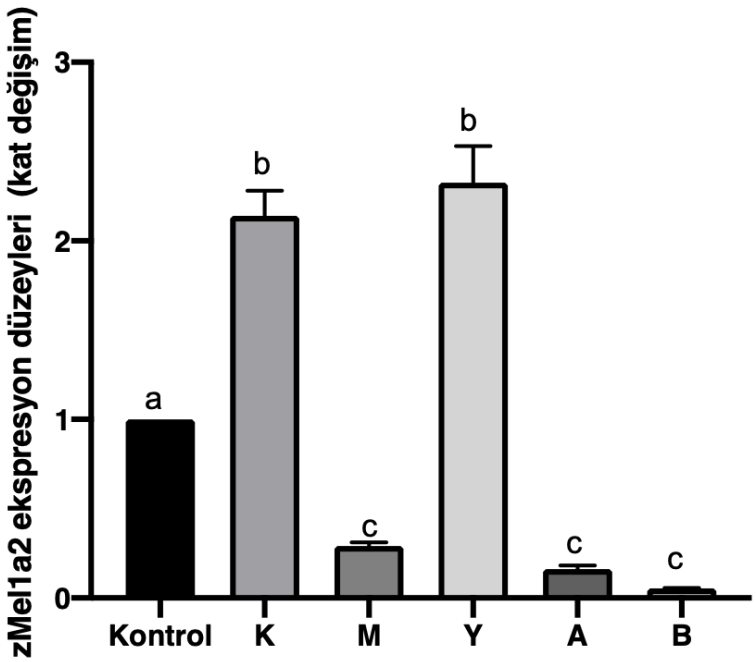
Işık maruziyetinin sonunda (72. saat), deney gruplarının RNA izolasyonları RNeasy Mini Kit ile QIAcube (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyonu amacıyla, RLT lizis tamponu eklenerek lizatlar elde edilmiştir. Etanol ilavesi sonrası RNA'nın RNeasy membranına bağlanabilmesi için gerekli işlemlerden geçirilen örnekler RNase-free su ile RNeasy spin kolonu yardımıyla RNA elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA RT$^{2}$ First Strand Kit ile Rotor Gene-Q (Qiagen) kullanılarak sentezlenmiştir. PCR yöntemi ile *zmela2* gen ekspresyonları incelenmiştir.

**Real Time (Eş zamanlı) RT-PCR Uygulaması**

Gen ekspresyon düzeyleri Qiagene RT SYBR Green kiti kullanılarak Rotor-Gene Q (Qiagen) ile belirlenmiştir. Verilerin istatiksel anlamlılıkları Graph Pad 7 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) istatistik programında değerlendirilmiştir.

**BULGULAR ve TARTIŞMA**

Çalışmamızın sonuçlarına göre, farklı LED ışık kaynaklarına maruziyet sonucunda zebra balığı embriyolarında *zmel1a2* ekspresyon düzeylerinde anlamlı derecede farklılıklara neden olmuştur. Kontrol grubu ile kıyaslandığında kırmızı ve yeşil LED ışık maruziyeti embriyolarda *zmel1a2* ekspresyonunu arttırırken, mavi, amber ve beyaz LED ışık kaynaklarına maruziyet durumunda *zmel1a2* ekspresyon düzeylerini azaltmıştır.




**Şekil 1:** Kontrol, Kırmızı (K), M (Mavi), Yeşil (Y), Amber (A), Beyaz (B) LED gruplarında *zmel1a2* ekspresyon düzeyleri. Gruplar arasında farklı harfler anlamlı derecede farklılık göstermektedir, $p<0,05$.

Önceki çalışmalarda, 400 ila 500 nm (ultraviyole yakınında) arasındaki dalga boylarındaki mavi ışığın gametler ve embriyolar üzerinde zararlı etkili olduğu gösterilmiştir. Görünür ışığa maruz kalan insan primer retinal epitel hücrelerinde, özellikle mavi bölge spektrumunda artmış mitokondriyal DNA hasarı bildirmiş ve süperoksit anyonunun mitokondriyal DNA lezyonlarına neden olan ana reaktif oksijen türü olduğunu göstermiştir. Kısa dalga boylu mavi ışığın da bazı böceklerde toksik etkileri vardır. D. Melanogaster'da mavi ışığın tüm büyüme aşamalarında öldürücü olduğunu gösterilmiştir (Shibuya ve ark, 2018).

Beyaz LED geniş bir spektruma sahiptir. Önceki çalışmamızda 1 watt gücünde beyaz LED maruziyetinin sarı pigmentasyon kaybı, azalmış vücut uzunluğu ve lokomotor aktivite, oksidan-antioksidan dengesizliği ve azalmış aanat2, mtnr1ba ve pax7 ifadeleri ile sonuçlandığını göstermiştik. Mevcut çalışmamızda da beyaz LED ışık maruziyetinin melatonin reseptörünü kodlayan diğer gen olan *zmel1a2* ifadesini azalttığını belirledik (Üstündağ ve ark, 2019).

Danilova ve ark. (2004) melatonine maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında gelişim hızının arttığı ve insan MT2'nin zebra balığı homoluğu *mtnr1ba* geninin ifadelerinin arttığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca endojen melatonin üretimi ve melatonin reseptör ekspresyonunun başlamasıyla melatoninin embriyoda hücre proliferasyonunu arttırdığını ve zebra balığı gelişimini teşvik ettiği öne sürülmüştür (Danilova ve ark, 2004).

Gündelik hayatımızda sirkadiyen döngünün aksamasına neden olan yapay aydınlatmalar, özellikle sanayileşmekte olan ülkeler başta olmak üzere kanser dahil farklı hastalıklar için önemli bir risk faktörü olma potansiyeline sahiptir. Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamız, embriyonel gelişim sürecinde farklı LED aydınlatma kaynaklarının melatonin reseptörü gen ifadelerinde değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. Bu risk faktörü ile ilgili daha fazla çalışmanın yapılması ve gerekli düzenlemelerin yapılması gerektiğine inanıyoruz.

## KAYNAKLAR

Danilova N, Krupnik VE., Sugden D, Zhdanova IV 2004. Melatonin stimulates cell proliferation in zebra fish embryo and accelerates its development. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal,18:51–753.

Kumar P, Ashawat MS, Pandit V, Sharma DK 2019. Artificial Light Pollution at Night: A Risk for Normal Circadian Rhythm and Physiological Functions in Humans. Current Environmental Engineering, *6*(2):111-125.

Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski LF Jr 1995. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. Neuron.,15(5): 1003–1015.

Shang EH, Zhdanova IV 2007. The Circadian System Is a Target and Modulator of Prenatal Cocaine Effects. PLoS ONE, 2(7): e587.

Shibuya K, Onodera S, Hori M 2018. Toxic wavelength of blue light changes as insects grow. PLoS One, 13(6): e0199266.

Üstündağ ÜV, Çalıskan-Ak E, Ateş PS, Ünal İ, Eğilmezer G., Yiğitbaşı T, Emekli-Alturfan E 2019. White LED Light Exposure Inhibits the Development and Xanthophore Pigmentation of Zebrafish Embryo. Scientific reports, *9*(1):1-12.

# Anatomical structure and ecological of *Orchis simia* Lam. and its on contribution to the taxonomy of Orchidaceae

Derviş Öztürk[1*]

[*1] Eskişehir Osmangazi University, Mahmudiye Equine Vocational School, Department of Plant and Animal Production, Eskişehir, Turkey

*Corresponding author e-mail: dozturk@ogu.edu.tr

## Abstract

In this study, in the present study reveals the morphological, anatomical and ecological characteristic of *Orchis simia* Lam. in Turkey. Plant materials of Orchis L. species were collected from one population, between 2018 in Eskişehir/Turkey. *Orchis simia* samples were analyzed for 5 morphological, 6 anatomical and soil characters and habitat properties. In morphological investigations, the structure of flower, lateral sepal, petal, dorsal sepal, lip, anther cap and column was determined. The findings were compared with those in Flora of Turkey. to habitat definition, *Orchis simia* grew up to 800 m to 1100 m. Also, *Quercus cerris* forests and glades were most common habitat of *Orchis simia*, found generally over calcareous soils.

**Keywords:** Anatomical, Morphological, *Orchis simia*, Eskişehir, Turkey

## INTRODUCTION

The flora of Turkey is represented 1.220 genus and 11.707 species and sub-species which belong to 154 family. Turkey is one of the country that has the richest flora in the World with 11.707 species and sub-species taxa. The family Orchidaceae comprises approximately 19,500 species distributed all around the world. Orchidaceae is the most famous and attractive plant family among all plant families of the world (Arditti, 1992; Prigdeon, 1992). Turkish orchidaceae were introduced in the volume 8 and 11 of Flora of Turkey. In Turkey, Orchidaceae is represented by 26 genus and about 166 species, of which 60 are endemic (Davis et al. 1978; Güner et al. 2000). Terrestrial orchids have creeping, much reduced, fibrous or fleshy rhizomes or tuber like roots. Orchis L. taxa are terrestrial orchids and diagnosed by a basal rosette and terminal, unbranched infloresence that is composed of small to moderately large resupinate flowers. This genus belonged to the Orchidinae tribe of which 30 species demonstrate their main distribution in the Northern regions of Europe and Asia (Renz and Taubenheim, 1984; Dressler, 1993; Kreutz, 2000; Kreutz, 2009). Most cultivars are tropical or sub-tropical. This species is known as salep in Turkey likes many other members of Orchidaceae (Baytop, 1997; Tuzlaci, 2006).

Orchid is erect perennials with globose to ellipsoid undivided tubers. Leaves unspotted or spotted, ±arranged near base. Emerging spike by spathe-like leaves, many flowered, ±cylindrical. Flowers in various shades of red, purple, and yellow, rarely white. Bracts membranous. Lateral sepals spreading to reflexed or all sepals connivent with petals, forming a hood. Labellum ±directed down-wards, entire or 3-lobed, with entire or ±divided middle lobe, glabrous or ±papillose above, with saccate to filiform spur. Anther firmly attached to short, erect column, folded median part of rostellum placed between the parallel anther cells (loculi). Pollinia 2, clavate, narrowed below to caudicles, attached to separate viscidia, which are anclosed in a single pouch (bursicula). Ovary cylindrical, sessile, twisted, glabrous.

Ecology, morphology and anatomy of several Turkish Orchid species have been studied earlier (Durmuskahya, 2013; Durmuskahya et al., 2014; Aybeke et al., 2010). Turkey has a rich biodiversity and has got more than 170 taxa (Kreutz, 2009). In high of the above, the aim of the present study was to investigate new ecological, morphological and anatomical information about another orchis taxa and to provide base knowledge for further studies.

The aim of the present study is to describe the morphological and anatomical structure and in addition to investigate the epidermal cell and stomata of leaves of *Orchis simia*.

## MATERIALS AND METHODS

*Orchis simia* was collected from Eskişehir: Sarıcakaya-Hekimdağ, below Quercus trees, 1000 m., 19.05.2018 and stored in the Eskişehir Osmangazi University Herbarium as a herbarium specimen (OUFE 12509). Determination of the species was made according to the Davis (1978 & 1988). Morphological descriptions are based on living plants and herbarium specimens.

Anatomical investigations were applied on the leaves of samples fixed in 70% alcohol. The transverse sections discarded from mid-vessels of leaves were stained with safranin and upper and lower surface layers were investigated in the media with 20% gliserin (Vardar et al., 2006; Ruzin, 1999). The well-staining sections were photographed on Leica DFC 295 color camera type, Leica DM 2500 light microscope. In this study, total 5 plant samples were collected for anatomical studies.

The surface layer of soil was removed and soil samples taken from 0-5 and 5-15 cm depth were analysed. The samples were air dried, ground, passed through a 2 mm sieve and subjected to physico-chemical analysis. Total soluble salts, pH, calcium carbonate content and texture were determined by the methods outlined in detail by Ozturk et al. (1997).

## Conclusion

- ***O. simia*** Lam.( (Figure 1)

Plant 15-45 cm. Basal leaves usually broadly lanceolate and unspotted. Spike ovoid to conical, withnflowers opening from top downwards. Flowers whitish pink, with an upswept hood; lip conspicuous and in shape of a man with body.



**Figure 1.** *Orchis simia* Lam. habitat view.

*Orchis simia* Lam is labellum 15-20 mm, centre whitish-rose, deeply segmented near base into linear lateral lobes, middle lobe ligulate, divided into 2 linear lobules; all lobules darker purple towards apex. Spur cylindrical. Fl. 4-5. Grassy hillsides, Scrub, on calcerous soils, *Quercus* scrub, 900-1000 m. (P.H. Davis, 1978) (Fig 1-2).

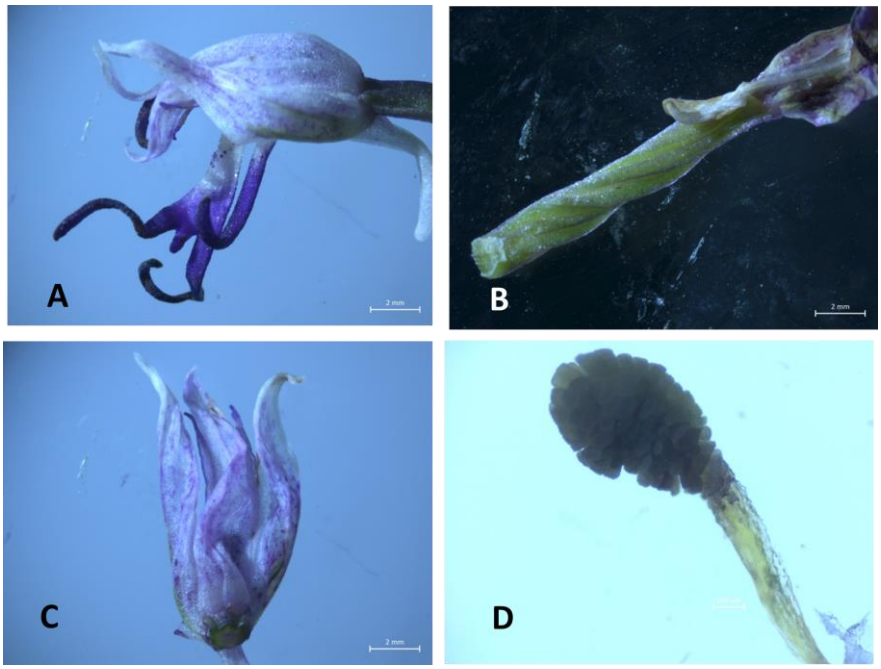



**Figure 2.** *O. simia* morphology: **A** flower, **B** Spur, **C** lateral lobes, **D** lip, anther cap and column,

**Root transverse section**

Cross section of root showed single layered epidermal cells. The cell length was longer than width (30-60 × 45-100 µm). Cortex consisted of 7-12 layered parenchymatous cells. The shape of cortex cells ranged from oval to globular. These cells were 60-100 µm in diameter and their walls were thin. Parancymatic cells located far from center were smaller than the ones close to center (Fig. 1A). Similar results have been earlier reported by several authors in members of Orchidaceae family (Aykebe *et al.*, 2010; Altundag *et al.*, 2012; Durmuskahya *et al.*, 2014). Endodermal cells (35-50 × 45-100 µm) with thickened wall were seen. Pericycle was single-layered and located under endodermis. (Fig. 3, Tab. 1).

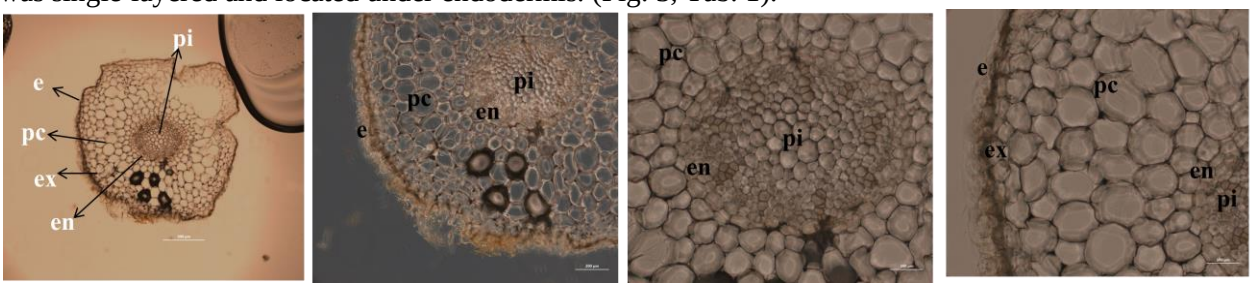



**Figure 3.** Root transverse section of ***Orchis simia*** Lam. **e** epidermis, **ex** exodermis, **pc** parenchymatic cells, **en** endodermis, **pi** pith (Bar 100 µm)

**Table 1.** Root anatomy measurement of *O. simia(*Figure 2)

| | **Width (µm)** | | **Length (µm)** | |
|---|---|---|---|---|
| | **Min.** | **Max.** | **Min.** | **Max.** |
| **Root** | | | | |
| Epidermis | 35.00 | 50.00 | 55.00 | 80.00 |
| Cortex parenchyma | 60.00 | 100.00 | | |
| Endodermis | 30.00 | 45.00 | 50.00 | 70.00 |

**Anatomical Section (Stem)**

The anatomical section of stem showed thick cuticle layer. Under this layer there was a single layered epidermis. Epidermal cells were square or rectangular shaped, 35-150 × 30- 50 µm. 8-16 layers of cortex cells were found under epidermis with 20-30 µm diameter. Few collenchyma cells with thick and lignified cell walls were found in cortex layer. 10-24 layered collenchyma cells gave durability to the stem. (Fig. 4). Vascular bundles were collateral and located in one ring. The bundle sheath consisted of sclerenchymatic cells, at the phloem pole of vascular bundles. Pith had many lacunas in the centre of stem due to the breakup of pith into pieces (Fig. 4, Tab. 2).

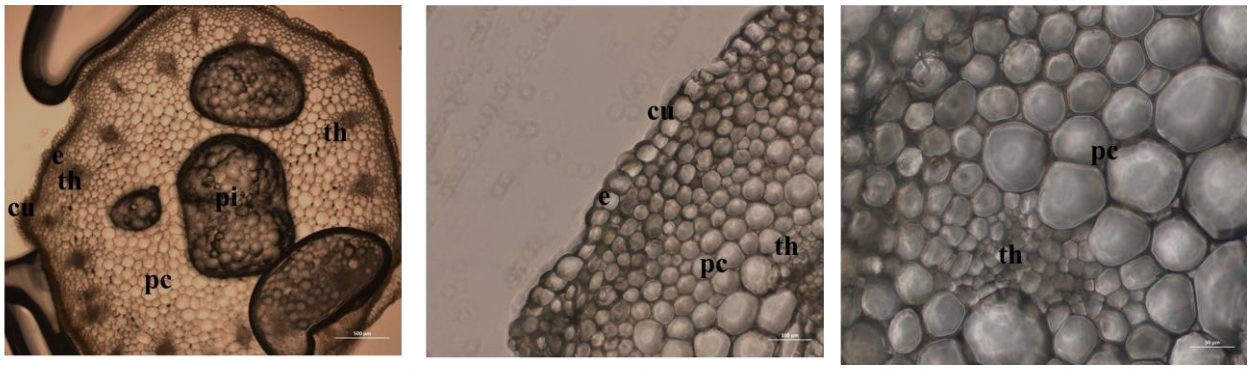



**Figure 4.** Stem transverse section of *Orchis simia* Lam. cu cuticle, e epidermis, pc parenchymatic cells, th trachea, pi pith (Bar 100 µm)

**Table 2.** Stem anatomy measurement of *O. simia* Lam. (Figure 4)

| | Width (µm) | | Length (µm) | |
|---|---|---|---|---|
| | Min. | Max. | Min. | Max. |
| Stem | | | | |
| Epidermis | 40 | 60 | 30 | 50 |
| Cortex parenchyma | 35 | 150 | | |
| Trachea (diameter) | 25 | 40 | | |

**Anatomical Results (Leaf )**

In leaves, adaxial epidermis consisted of a single layer of rectangular cells 25-80 × 30-60 µm with smooth cuticle. Abaxial epidermis was 55-80 × 35-50 µm. Adaxial epidermis cells were bigger than abaxial epidermis cells and adaxial cuticle thicker than adaxial. These features were observed in *Orchis laxiflora* Lam and *O. purpurea* Hudson by Aybeke *et al.* (2010). But Sevgi *et al.* (2012a) observed that these species had thicker cuticle on abaxial side and they had similar thickness on both adaxial and abaxial surface. Mesophyll layer was homogenous, without any differentiation in to palisade and sponge parenchyma tissues (Fig. 5, Tab. 3).

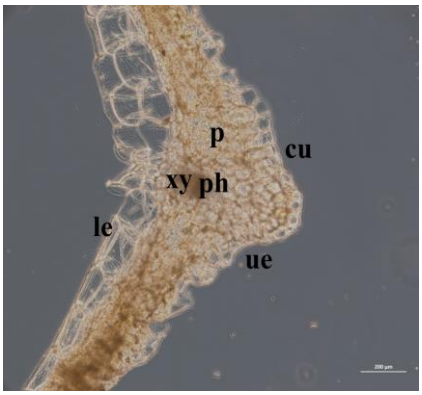



**Figure 5.** Leaf transverse section of ***Orchis simia*** Lam. **c** cuticle, **ue** upper epidermis, **p** parenchyma, **ph** phloem, **xy** xylem, **le** lower epidermis (Bar 100 µm)

**Table 3.** Leaf anatomy measurement of *O. simia* (Figure 5)

| | Width (µm) | | Length (µm) | |
|---|---|---|---|---|
| | **Min.** | **Max.** | **Min.** | **Max.** |
| **Leaves** | | | | |
| Adaxial epidermis | 30 | 80 | 30 | 55 |
| Mesophyll cells | 25 | 55 | | |
| Abaxial epidermis | 25 | 50 | 35 | 60 |

**Anatomical Results (Leaf superficial )**

Leaves surface of investigated species was glabrous like many other orchid species. In leaves, adaxial epidermis consisted of a single layer of rectangular cells 50-110 × 80-85 µm with smooth cuticle. Abaxial epidermis was 45-100 × 55-155 µm. Adaxial epidermis cells were bigger than abaxial epidermis cells and adaxial cuticle thicker than adaxial. (Fig. 6, Tab. 4).

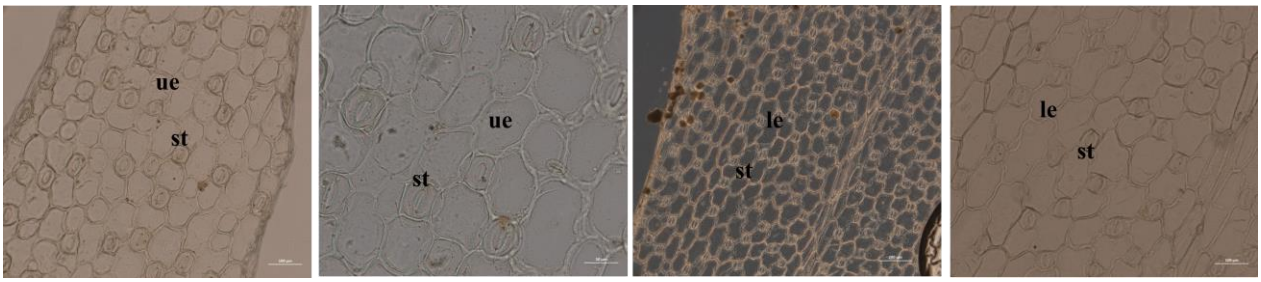



**Figure 6.** Leaf epidermal peeling of ***Orchis simia*** Lam. **ue** upper epidermis, **le** lower epidermis, **st** stomata (Bar 100 µm)

**Table 4.** Leaf anatomy measurement of *O. simia* (Figure 6)

| | Width (µm) | | Length (µm) | |
|---|---|---|---|---|
| | **Min.** | **Max.** | **Min.** | **Max.** |
| **Leaves** | | | | |
| Adaxial epidermis | 50 | 100 | 60 | 155 |
| Mesophyll cells | 45 | 55 | | |
| Abaxial epidermis | 45 | 80 | 55 | 110 |

In this study *Orchis simia* Lam. was investigated ecology, morphologically and anatomically. Morphological drawings of flower, lateral sepal, dorsal sepal, petal, lip, anther cap and column were made. The results obtained from morphological studies were generally consistent with the description given in the Flora of Turkey (Davis 1978 & 1988). The leaf is isolateral and compose of parenchymatic cells with intensively chloroplast. Vascular bundle is collateral and there hasn't bundle sheath. Stoma cells are located only on the abaxial side of the epidermis, as shown in Figure 4; just as Sevgi et al. (2012) were reported. As a whole this study increase the knowledge of the morphology and anatomy in Orchis reporting data about the *Orchis simia* Lam.

Cross section of root showed single layered epidermal cells. The cell length was longer than width (35-50 × 55-80 µm). Cortex consisted of 8-12 layered parenchymatous cells. The shape of cortex cells ranged from oval to globular. These cells were 55-110 µm in diameter and their walls were thin. Parancymatic cells located far

from center were smaller than the ones close to center (Fig. 2). Endodermal cells (30-45 × 50-70 µm) with thickened wall were seen but were not visible clearly. Pericycle was single-layered and located under endodermis. Xylem consisted of radially arranged 3 to 4 vessels, while pith was made up of parenchymatous cells. (Fig. 2).

The anatomical section of stem showed thick cuticle layer. Under this layer there was a single layered epidermis. Epidermal cells were square or rectangular shaped, 40-60 × 30- 50 µm. 7-14 layers of cortex cells were found under epidermis with 35-150 µm diameter. Few collenchyma cells with thick and lignified cell walls were found in cortex layer. Cortical parenchyma, a thinner layer than collenchyma was found with large amount of starch grains. Presence of collenchyma cells in *Ophrys* L. and *Dactylorhiza* Necker ex Nevski have been reported previously in other studies (Altundag *et al.*, 2012; Aybeke *et al.*, 2010). Vascular bundles were collateral and located in one ring. The bundle sheath consisted of sclerenchymatic cells, at the phloem pole of vascular bundles. Pith had many lacunas in the centre of stem due to the breakup of pith into pieces (Fig. 3).

Leaves surface of investigated species was glabrous like many other orchid species. In leaves, adaxial epidermis consisted of a single layer of rectangular cells (30-80 × 30-55 µm) with smooth cuticle. Abaxial epidermis was 25-50 × 35-60 µm. Adaxial epidermis cells were bigger than abaxial epidermis cells and adaxial cuticle thicker than adaxial. (Fig. 6).

As far as ecological status is concerned, this species is rare as compared with other *Orchis* species like, *Orchis anatolica*, *Orchis italica* Poiret and *Orchis simia* Lam. It is generally found in small groups. Due to its extreme habitat, its population are limited. Therefore, some scientist accept that it is an endangered species. Because of local use of this species like in preparing *salep* (Tecimen et al., 2010), natural population is decreasing day by day. As compared to other orchid species, which are used for salep making, such as *Serapias vomeracea*, *Orchis anatolica*, *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich., it was found that in different habitat it blossoms in later time and these reason makes it easy target for plant collectors.

This species usually prefers calcareous soil. It is difficult to find them in clay or on alluvial soil. The soil analysis showed that at 0-5 cm soil depth, stoniness was around 16.8 % and these are mid stony soils (Cepel, 1988). The sand, silt and clay were 59. 25 and 22 % respectively at this depth. Soil was neutral with pH 6.86 and had high humus content. Total nitrogen content of the soil was 0.30 % and C:N ratio 35.15 (Table 2).

## References

Akman, Y., Ketenoğlu, O., Kurt, L., & Vural, M. (2014). The steppe vegetation of Inner Anatolia.

Arditti, J. (1992). Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons.

Ataşlar, E. Morpho-anatomical structure of *Orchis mascula* (L.) L. and its contribution to the taxonomy of Orchidaceae.

Aybeke, M., Sezik, E., & Olgun, G. (2010). Vegetative anatomy of some Ophrys, Orchis and Dactylorhiza (Orchidaceae) taxa in Trakya region of Turkey. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 205(2), 73-89.

Baytop, T. (1997). Türkce bitki adlari sözlügü. Türk tarih kurumu.

Davis, P.H. 1978. Flora of Turkey and The East Aegean Islands 8, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh

Dreesler, R.L.: Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, p. 314 (1993).

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., & Başer, K. H. C. (2000). Flora of Turkey and the east Aegean Islands. Supplement, 2, 28.

Kreutz, C.A.J.: Orchidaceae. In: Flora of Turkey and the East Aegean islands (Eds.: A. Guner, N. Ozhatay, T. Ekim, K.H.C. Baser). Edinburg UniversityPress,Edinburgh, 11, 274 – 303 (2000).

Kreutz, C.A.J.: Orchids of Turkey, Botanical Properties, Ecological Requirements, Natural Spreading Sites, Vital Threats, Precautions for Protection (Trans. & Cont.: A. Colak), Rota Publications, pp. 55-848 (2009).

Renz, J., & Taubenheim, G. (1984). Dactylorhiza Necker ex Nevski. Flora of Turkey and the east Aegean islands, 8, 535-551.

Renz, J. and G. Taubenheim: Orchis L. (Orchidaceae), In: Flora of Turkey and the East Aegean islands (Eds.: P.H. Davis) . Edinburgh, University Press, Edinburgh. 8, 451-600 (1984).

Sevgi, E., Altundag, E., Kara, O., Sevgi, O., Tecimen, H. B., & Bolat, I. (2012). Morphological, anatomical and ecological studies on some Orchis (Orchidaceae) taxa of Mediterranean region, Turkey. Journal of environmental biology, 33(2), 343.

Tuzlacı, E. (2006). Türkiye bitkileri sözlüğü: türkçe-latince, latince-türkçe; bitki adlarının özel açıklamaları. Alfa Basım Yayım Dağıtım.

Vardar, Y. (1987). Botanikte preparasyon tekniği. Ege Üniversitesi, Izmir.

Yue, T. L., Gu, J. L., Wang, C., Reith, A. D., Lee, J. C., Mirabile, R. C., ... & Ohlstein, E. H. (2000). Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. Journal of Biological Chemistry, 275(48), 37895-37901.

Zarinkamar, F. (2006). Density, size and distribution of stornata in different monocotyledons. Pak J Biol Sci, 9, 1650-1659.

# Transglutaminaz enzimi kullanılarak üretilen pastırma çeşitlerinin uçucu bileşikleri

Fatma Yağmur HAZAR[1]*, Güzin KABAN[2], Mükerrem KAYA[2]

*[1]Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kastamonu, Türkiye
[2]Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

*fyhazar@kastamonu.edu.tr

## Özet

Bu araştırmada transglutaminaz enziminin, pastırma çeşitlerinin uçucu bileşiklerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla iki karkasın 5 farklı bölgesinden çıkarılan toplam 20 pastırmalık et (kuşgömü, sırt, şekerpare, kürek ve bohça) iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup kontrol grubu olarak değerlendirilirken, ikinci grup ise 1.kurutmadan sonra %0.50 oranında transglutaminaz enzimi ile muamele edilmiştir. Üretim geleneksel yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Pastırma çeşitlerinde alkoller, aldehitler, ketonlar, aromatik hidrokarbonlar, alifatik hidrokarbonlar, sülfürlü bileşikler, esterler, furanlar, nitrojenli bileşikler ve asitler grubuna dahil toplamda 48 uçucu bileşik belirlenmiştir. Bu bileşiklerden 9'u (etanol, hekzanal, 2-heptenal, benzaldehit, 2,4-heptadienal, 2-octanon, 1-metil-2-(metiletenil)-benzen, stiren and undekan) enzim uygulamasından istatistiki olarak etkilenmiştir ($P<0,01$ veya $P<0,05$). Pastırma çeşitleri arasında ise 14 uçucu bileşik açısından farklılıklar belirlenmiştir ($P<0.05$). Enzim uygulaması x pastırma çeşidi interaksiyonu ise benzaldehit ve asetik asit üzerinde $P<0.01$ düzeyinde değişime neden olmuştur.
**Anahtar Kelimeler:** Pastırma, transglutaminaz, uçucu bileşik profili

## Volatile compounds of pastırma types produced using transglutaminase enzyme

## Abstract

In this study, it was aimed to determine the effect of the using transglutaminase enzyme on the volatile compounds of pastırma types. For this purpose, 20 meat pieces for pastırma production, which are obtained from 5 different regions (kuşgömü, sırt, şekerpare, kürek ve bohça) of two carcasses, are divided into two groups. While the first group was evaluated as the control group, the second group was treated with 0.50% transglutaminase enzyme after the first drying. Production was carried out according to the traditional method. A total of 48 volatile compounds including alcohols, aldehydes, ketones, aromatic hydrocarbons, aliphatic hydrocarbons, sulphur compounds, esters, furans, nitrogenous compounds and acids were identified in the pastırma types. Nine of these compounds (ethanol, hexanal, 2-heptenal (E), benzaldehyde, 2,4-heptadienal (E,E), 2-octanone, 1-methyl-2-(methylethenyl)-benzene, styrene and undecane) were statistically affected by enzyme application ($P<0,01$ or $P<0,05$). Differences were detected in terms of 14 volatile compounds among the pastırma types ($P<0.05$). The enzyme application x pastırma type interaction caused a change on benzaldehyde and acetic acid at the level of $P<0.01$.
**Keywords:** Pastırma, transglutaminase, volatile compound profile

## GİRİŞ

Pastırma parça halde işlenen geleneksel bir Türk et ürünüdür. Bir karkastan 16 veya daha fazla pastırmalık et elde edilmektedir. Pastırmalar isimlendirilirken etin elde edildiği bölge dikkate alınmaktadır (Kaban 2009). Bu çeşitlerden sırt ve kuşgömü birinci sınıf, bohça şekerpare ve kürek ise ikinci sınıf pastırma olarak sınıflandırılmaktadır (Akköse et al. 2018).

Parça halde kuru kür edilmiş et ürünlerinin üretimi boyunca lipolizis ve proteolizis gibi birçok fiziksel ve kimyasal reaksiyon meydana gelmektedir (Toldra and Flores 1998; Flores et al 2007; Lorenzo et al 2008; Kaban 2013). Bu reaksiyonlar sonucu oluşan serbest aminoasitler ve serbest yağ asitleri gibi bileşikler lezzet üzerine etkili bileşiklerin öncül maddelerdir (Toldra and Flores 1998; Kaban 2013). Ayrıca bu tip ürünlerde aromanın gelişimi üzerine etkili diğer reaksiyonlar lipit oksidasyonu (Harkouss et al 2015), strecker degradaasyonu ve Maillard reaksiyonudur (Virgili et al. 2007; Kaban 2009; Martines-Onandi et al 2017).

Pastırma çeşitlerinde transglutaminaz enzimi kullanımının ürünün uçucu bileşik profili üzerine etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Mevcut araştırmada pastırma çeşitlerinde (sırt, kuşgömü, şekerpare, kürek ve bohça) transglutaminaz enzimi kullanımının (kontrol ve %0.50) uçucu bileşik profili üzerine etkisi incelenmiştir.

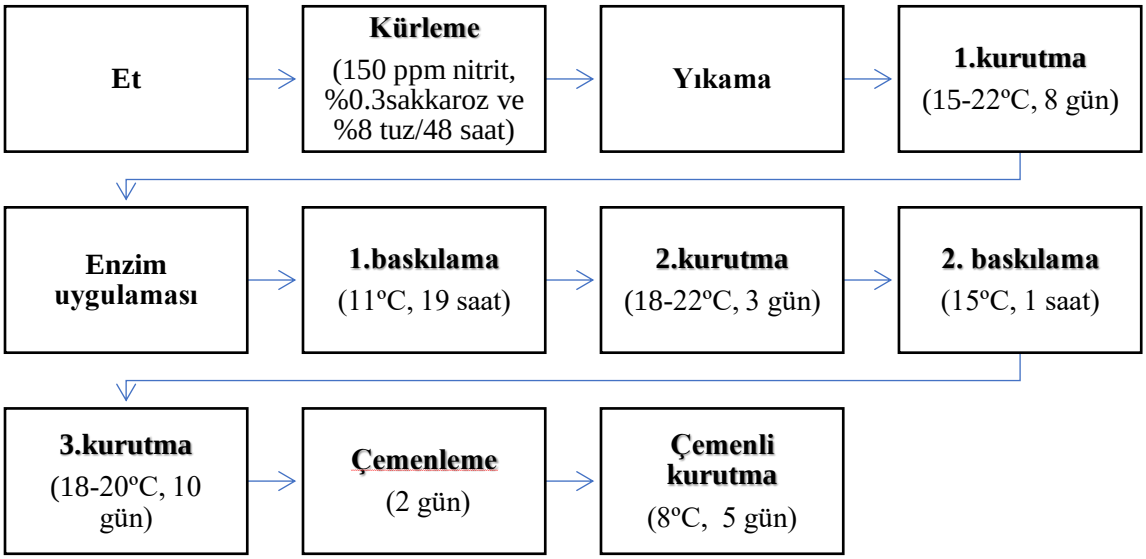
## MATERYAL VE METOT

Pastırma üretiminde hammadde olarak kesimden sonra 48 saat dinlendirilmiş iki sığır karkasının 5 farklı bölgesinden çıkarılan pastırmalık etler (kuşgömü, sırt, şekerpare, kürek ve bohça) kullanılmıştır. Elde edilen 20 pastırmalık et iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup kontrol grubu olarak değerlendirilirken, ikinci grup ise 1.kurutmadan sonra %0.50 oranında transglutaminaz enzimi ile muamele edilmiştir. Pastırma üretimi geleneksel yöntemle özel bir et işletmesinde gerçekleştirilmiştir.

Pastırma üretimi Şekil 1'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Pastırma örneklerinin uçucu bileşik profili Kaban (2009) tarafından verilen metoda göre gerçekleştirilmiştir.

## TABLOLAR VE ŞEKİLLER




**Şekil 1.** Pastırma Üretimi

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Pastırma çeşitlerinde alkoller, aldehitler, ketonlar, aromatik hidrokarbonlar, alifatik hidrokarbonlar, sülfürlü bileşikler, esterler, furanlar, nitrojenli bileşikler ve asitler grubuna dahil toplamda 48 uçucu bileşik belirlenmiştir. Belirlenen uçucu bileşiklerden etanol, hekzanal, benzaldehit, 2-oktanon, 1-metil-2-(1-metiletil)-benzen ve asetik asit enzim uygulamasından $P<0,01$ seviyesinde ve 2,4-heptadienal (E,E), stiren ve undekan ise $P<0,05$ seviyesinde etkilenmiştir. Hekzanal hariç enzim uygulamasından etkilenen diğer bileşikler kontrol grubunda daha yüksek ortalama değerler göstermiştir. Ayrıca pastırma çeşidi faktörü asetaldehit, 2-heptenal (E), trans-2-nonanal, dialil disülfür, asetik asit, benzaldehit, 2,4-nonadienal, 2-metil-3-fenil propanal, stiren, hekzan, tridekan, metil-siklopentan, 3,3'tiyobis-1-propen ve 2-pentil furan üzerinde önemli veya çok önemli seviyede etkili olmuştur. Pastırma çeşitleri arasındaki bu farklılığın karkasın farklı bölgelerinden çıkarılan etlerin birbirinden farklı özellik göstermesinden ileri geldiği düşünülmektedir.

**Tablo 1.** Transglutaminaz enzimi kullanılarak üretilen pastırma çeşitlerinin uçucu bileşik profili

| Bileşik Adı | Enzim Uygulaması (EU) | | P değeri | Pastırma çeşidi(PÇ) | | | | | P değeri | EUxPÇ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kontrol | %0,50 | | Sırt | Kuşgömü | Şekerpare | Kürek | Bohça | | P Değeri |
| **Alkoller** | | | | | | | | | | |
| Etanol | 2,00±1,61a | 0,74±0,77b | P<0,01 | 1,37±1,56 | 1,78±1,92 | 1,91±1,37 | 0,55±0,48 | 1,22±1,19 | P>0,05 | P>0,05 |
| 1-propen-2-ol | 3,84±2,68 | 3,30±2,45 | P>0,05 | 2,95±2,21 | 3,04±2,59 | 4,09±2,64 | 4,99±2,90 | 2,78±2,28 | P>0,05 | P>0,05 |
| 3-hekzanol | 0,55±0,36 | 0,67±0,24 | P>0,05 | 0,54±0,30 | 0,64±0,18 | 0,55±0,37 | 0,71±0,36 | 0,62±0,35 | P>0,05 | P>0,05 |
| **Aldehitler** | | | | | | | | | | |
| Asetaldehit | 2,64±2,08 | 3,47±1,88 | P>0,05 | 3,50±1,89ab | 4,87±1,25a | 2,03±1,44bc | 1,10±0,65c | 3,78±2,12a | P<0,01 | P>0,05 |
| Heptanal | 0,47±0,35 | 0,36±0,31 | P>0,05 | 0,38±0,37 | 0,45±0,37 | 0,43±0,36 | 0,35±0,35 | 0,46±0,28 | P>0,05 | P>0,05 |
| Pentanal | 2,06±1,57 | 2,93±1,55 | P>0,05 | 2,50±1,42 | 3,02±2,26 | 2,40±1,36 | 2,39±1,61 | 2,16±1,50 | P>0,05 | P>0,05 |
| Hekzanal | 22,60±15,71b | 38,16±17,40a | P<0,01 | 26,08±12,33 | 33,54±20,73 | 30,77±18,09 | 30,09±20,45 | 31,41±21,82 | P>0,05 | P>0,05 |
| 2-hekzenal | 0,23±0,23 | 0,16±0,17 | P>0,05 | 0,22±0,26 | 0,35±0,21 | 0,15±0,18 | 0,12±0,10 | 0,13±0,17 | P>0,05 | P>0,05 |
| Heptanal | 2,05±1,31 | 2,66±1,11 | P>0,05 | 2,62±1,17 | 3,02±1,62 | 2,18±1,10 | 2,13±1,20 | 1,84±0,93 | P>0,05 | P>0,05 |
| 2-heptenal (E) | 0,64±1,01a | 0,19±0,40b | P<0,05 | 0,46±0,70b | 1,37±1,19a | 0,19±0,34b | 0,07±0,19b | 0,00±0,00b | P<0,01 | P>0,05 |
| Benzaldehit | 14,59±7,23a | 5,01±2,84b | P<0,01 | 7,06±2,31c | 7,93±1,92bc | 10,70±9,81abc | 12,11±8,31a | 11,20±9,93ab | P<0,05 | P<0,01 |
| Oktanal | 2,88±1,44 | 3,22±1,12 | P>0,05 | 3,10±1,44 | 2,92±1,37 | 3,11±1,18 | 3,23±1,41 | 2,89±1,34 | P>0,05 | P>0,05 |
| 2,4-heptadienal (E,E)- | 0,98±0,69a | 0,46±0,48b | P<0,05 | 0,63±0,20 | 1,00±0,46 | 0,57±0,67 | 0,66±0,64 | 0,74±1,03 | P>0,05 | P>0,05 |
| 2-oktenal (E)- | 1,98±1,03 | 1,65±0,86 | P>0,05 | 1,87±0,89 | 2,44±0,96 | 1,59±0,77 | 1,72±1,00 | 1,44±1,03 | P>0,05 | P>0,05 |
| Nonanal | 8,07±3,76 | 8,09±2,47 | P>0,05 | 7,19±3,46 | 6,91±2,65 | 10,06±3,68 | 8,41±2,67 | 7,83±2,85 | P>0,05 | P>0,05 |
| Trans-2-nonanal | 1,48±0,35 | 1,37±0,49 | P>0,05 | 1,37±0,33b | 1,89±0,31a | 1,26±0,58b | 1,42±0,18b | 1,19±0,26b | P<0,01 | P>0,05 |
| 2,4-nonadienal | 0,61±0,35 | 0,58±0,35 | P>0,05 | 0,36±0,34b | 0,68±0,32b | 0,72±0,55b | 1,50±1,21a | 0,57±0,33b | P<0,05 | P>0,05 |
| 2-metil-3-fenil-propanal | 1,24±0,49 | 1,30±0,64 | P>0,05 | 1,23±0,60ab | 1,78±0,15a | 1,17±0,52b | 1,27±0,57ab | 0,89±0,58b | P<0,05 | P>0,05 |
| 2-metil-2-bütenal | 0,69±0,47 | 0,72±0,51 | P>0,05 | 0,72±0,58 | 0,91±0,59 | 0,63±0,46 | 0,65±0,31 | 0,61±0,49 | P>0,05 | P>0,05 |
| 2,4-dekadienal (E,E)- | 0,41±0,42 | 0,50±0,41 | P>0,05 | 0,21±0,33 | 0,52±0,40 | 0,38±0,37 | 0,48±0,44 | 0,68±0,48 | P>0,05 | P>0,05 |
| **Ketonlar** | | | | | | | | | | |
| 2-heptanon | 0,50±0,24 | 0,36±0,26 | P>0,05 | 0,39±0,35 | 0,50±0,27 | 0,45±0,25 | 0,36±0,19 | 0,45±0,23 | P>0,05 | P>0,05 |
| 2,3-oktandion | 7,46±4,14 | 7,73±3,55 | P>0,05 | 6,08±2,85 | 6,41±3,62 | 8,24±4,28 | 8,46±3,27 | 8,75±4,86 | P>0,05 | P>0,05 |
| 6-metil-5-hepten-2-on | 0,37±0,32 | 0,23±0,20 | P>0,05 | 0,34±0,42 | 0,24±0,26 | 0,25±0,21 | 0,28±0,13 | 0,37±0,33 | P>0,05 | P>0,05 |
| 2-oktanon | 0,54±0,40a | 0,22±0,20b | P<0,01 | 0,51±0,49 | 0,48±0,40 | 0,42±0,26 | 0,21±0,16 | 0,30±0,34 | P>0,05 | P>0,05 |
| 5-metil-3-hepten-2-on | 0,39±0,28 | 0,34±0,23 | P>0,05 | 0,42±0,26 | 0,32±0,23 | 0,28±0,26 | 0,32±0,16 | 0,50±0,33 | P>0,05 | P>0,05 |
| 3-okten-2-on | 0,98±0,38 | 1,00±0,60 | P>0,05 | 0,90±0,38 | 0,99±0,40 | 1,04±0,30 | 0,89±0,27 | 0,11±0,92 | P>0,05 | P>0,05 |
| 3,5-oktadien-2-on | 0,69±0,38 | 0,69±0,32 | P>0,05 | 0,59±0,29 | 0,72±0,41 | 0,88±0,41 | 0,61±0,41 | 0,65±0,19 | P>0,05 | P>0,05 |
| **Aromatik Hidrokarbonlar** | | | | | | | | | | |
| 1-metil-2-(1-metiletil)-benzen | 0,84±0,72a | 0,39±0,24b | P<0,01 | 0,89±0,91 | 0,76±0,44 | 0,60±0,37 | 0,37±0,21 | 0,45±0,66 | P>0,05 | P>0,05 |
| Stiren | 0,13±0,19a | 0,03±0,08b | P<0,05 | 0,19±0,24a | 0,14±0,16ab | 0,06±0,11ab | 0,00±0,00b | 0,00±0,00b | P<0,05 | P>0,05 |
| **Alifatik Hidrokarbonlar** | | | | | | | | | | |
| Hekzan | 50,62±20,69 | 60,80±19,87 | P>0,05 | 46,97±25,67bc | 42,33±12,26c | 67,42±22,99a | 59,25±20,23abc | 62,56±10,86ab | P<0,05 | P>0,05 |
| Oktan | 0,60±0,46 | 0,58±0,38 | P>0,05 | 0,56±0,45 | 0,61±0,41 | 0,68±0,45 | 0,52±0,46 | 0,58±0,42 | P>0,05 | P>0,05 |
| Nonan | 0,25±0,12 | 0,21±0,12 | P>0,05 | 0,21±0,12 | 0,23±0,13 | 0,28±0,09 | 0,18±0,12 | 0,25±0,12 | P>0,05 | P>0,05 |
| Dekan | 0,40±0,25 | 0,30±0,14 | P>0,05 | 0,31±0,10 | 0,46±0,38 | 0,39±0,13 | 0,29±0,14 | 0,28±0,13 | P>0,05 | P>0,05 |
| Undekan | 1,35±0,59a | 0,94±0,55b | P<0,05 | 0,93±0,60 | 1,35±0,48 | 1,22±0,81 | 1,21±0,41 | 1,02±0,69 | P>0,05 | P>0,05 |
| Dodekan | 1,75±0,95 | 1,63±0,67 | P>0,05 | 1,48±0,74 | 1,97±1,14 | 1,56±0,54 | 1,65±0,53 | 1,80±1,05 | P>0,05 | P>0,05 |
| Tridekan | 1,16±1,15 | 1,58±0,99 | P>0,05 | 0,78±0,69b | 0,83±0,66b | 2,10±1,48a | 2,01±1,02a | 1,15±0,69ab | P<0,05 | P>0,05 |
| Tetradekan | 0,51±0,50 | 0,37±0,47 | P>0,05 | 0,43±0,31 | 0,23±0,33 | 0,60±0,77 | 0,58±0,47 | 0,37±0,43 | P>0,05 | P>0,05 |
| Metil-siklopentan | 5,10±2,08 | 5,25±2,47 | P>0,05 | 3,71±2,63b | 3,85±0,96b | 5,92±2,66a | 6,02±2,20a | 6,36±1,04a | P<0,05 | P>0,05 |
| **Sülfürlü Bileşikler** | | | | | | | | | | |
| Alil merkaptan | 1,66±1,38 | 1,04±0,55 | P>0,05 | 1,42±1,94 | 0,92±0,58 | 1,75±0,78 | 1,07±0,64 | 1,60±0,95 | P>0,05 | P>0,05 |
| 3,3'tiyobis-1-propen | 2,10±1,63 | 2,03±1,29 | P>0,05 | 1,79±1,38b | 1,32±0,83b | 3,46±1,90a | 1,46±0,67b | 2,30±1,30ab | P<0,05 | P>0,05 |
| Metil 2-propenil disülfür | 1,31±0,75 | 1,28±0,60 | P>0,05 | 1,53±0,92 | 1,26±0,61 | 1,56±0,72 | 0,86±0,33 | 1,28±0,56 | P>0,05 | P>0,05 |
| Dialil disülfür | 13,16±6,65 | 13,61±5,59 | P>0,05 | 11,96±6,23b | 10,67±3,89b | 20,22±6,91a | 9,70±2,14b | 14,39±4,26b | P<0,01 | P>0,05 |
| 3(metiltiyo)-1-propen | 0,55±0,59 | 0,44±0,39 | P>0,05 | 0,47±0,47 | 0,34±0,38 | 0,83±0,60 | 0,32±0,29 | 0,54±0,61 | P>0,05 | P>0,05 |
| **Esterler** | | | | | | | | | | |
| 2,4-hekzadienoik asit, metil ester | 0,30±0,41 | 0,13±0,37 | P>0,05 | 0,45±0,62 | 0,39±0,42 | 0,12±0,22 | 0,11±0,27 | 0,00±0,00 | P>0,05 | P>0,05 |
| **Furanlar** | | | | | | | | | | |
| 2-bütil furan | 0,19±0,12 | 0,20±0,12 | P>0,05 | 0,17±0,14 | 0,15±0,14 | 0,20±0,13 | 0,22±0,05 | 0,23±0,10 | P>0,05 | P>0,05 |
| 2-pentil-furan | 1,01±0,72 | 1,11±0,47 | P>0,05 | 0,91±0,60ab | 0,48±0,48b | 1,27±0,49a | 1,24±0,32a | 1,40±0,66a | P<0,05 | P>0,05 |
| **Nitrojenli Bileşikler** | | | | | | | | | | |
| 1-metil-1H-pirol | 0,42±0,42 | 0,46±0,26 | P>0,05 | 0,44±0,40 | 0,38±0,29 | 0,45±0,47 | 0,42±0,34 | 0,50±0,24 | P>0,05 | P>0,05 |
| **Asitler** | | | | | | | | | | |
| Asetik asit | 0,77±0,69a | 0,23±0,26b | P<0,01 | 0,21±0,30c | 0,34±0,28bc | 0,76±0,73ab | 0,89±0,79a | 0,31±0,43c | P<0,01 | P<0,05 |

Her bir sütunda aynı satırda farklı harfle işaretlenen ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır (P<0,05).

## SONUÇ

Pastırma çeşitlerinin uçucu bileşik profili açısından birbirinden oldukça farklılık gösterdiği ve enzim uygulamasının bazı uçucu bileşiklerde azalmaya neden olduğu sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM 16/AR-GE/29 no'lu proje ile desteklenmiştir.

## KAYNALAR

Kaban G 2009. Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastırma processing. Meat Science, 82: 17-23.

Akköse A, Kaban G, Karaoğlu MM, Kaya M 2018. Characteristics of pastırma types produced from water buffalo meat. Kafkas Universitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 24(2): 179-185.

Flores M, Gianelli MP, Pérez-Juan M, Toldrá F 2007. Headspace concentration of selected dry-cured aroma compounds in model systems as affected by curing agents. Food Chemistry, 102: 488–493.

Kaban, G 2013. Sucuk and pastırma: Microbiological changes and formation of volatile compounds. Meat Science, 95: 912–918.

Lorenzo JM, Fontán MCG, Franco I, Carballo J 2008. Biochemical characteristics of dry-cured lacón (a Spanish taraditional meat product) throughout the manufacture, and sensorial properties of the final product. Effect of some additives. Food Control, 19: 1148-1158.

Toldrá F, Flores M 1998. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. Critical Reviews in Food Science, 38(4): 331-352.

Harkouss R, Astruc T, Lebert A, Gatellier P, Loison O, Safa H, Portanguen S, Parafita E, Mirade PS 2015. Quantitative study of the relationships among proteolysis, lipid oxidation, structure and texture throughout the dry-cured ham process. Food Chemistry, 166: 522-530.

Virgili R, Saccani G, Gabba L, Tanzi E, Bordini CS 2007. Changes of free amino acids and biogenic amines during extended ageing of Italian dry-cured ham. LWT- Food Science and Technology, 40: 871-878.

Martínez-Onandi N, Rivas-Cañedo A, Ávila M, Garde S, Nuñez M, Picon A 2017. Influence of physicochemical characteristics and high pressure processing on the volatile fraction of iberian dry-cured ham. Meat Science, 131: 40-47.

# Studies to increase the shelf life of traditional meat products exposed for sale in our country

Gülen Yıldız Turp[1*], Şeyma Nur Çiçek[2]

[1]Ege University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Izmir, Turkey

[2]Ege University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Izmir, Turkey

*Corresponding author e-mail: gulen.yildiz.turp@ege.edu.tr

**Abstract**

Turkey is one of the most important cuisines in the world with a deep-rooted and versatile culinary culture containing the original characteristics of local cuisines. There are many local products in Turkey varied according to each city. Turkish cuisine is famous in the world, especially for meat dishes such as shish and doner kebabs. In addition, there are various traditional meat products in Turkish cuisine such as roasting, fermented sausage (sucuk), pastırma, tantuni. These local products may differ depending on the region that are produced, and may vary according to the production technique and raw materials. Fermented sausage and pastırma come first in traditional meat products which are commonly consumed in Turkey. Kavurma (roasting) is a meat product prepared by cooking beef or mutton together with salt and fat of the animal species from which meat is obtained. Tantuni is preferably consumed by cooking in a special pan after adding various vegetables, spices and oil using beef, mutton or chicken. The production of doner kebab is based on the principle of cooking the beef or lamb meat that is shaped in rotary sticks after being marinated. Shelf-life studies have gained importance to deliver traditional meat products to a large number of consumers while maintaining their quality features and safety. In the literature, there are studies on different methods such as adding natural antimicrobial and antioxidant components, using the starter culture and probiotics, different packaging techniques and process modifications in order to extend the shelf life of traditional meat products and give functional properties to the product. Usage of natural antioxidants (sage, thyme, ginger, green tea, rosemary) were detected as considerably effective on reduction of lipid oxidation in sausage production. More research is needed in order for traditional meat products to reach consumers while having a certain shelf life and maintaining their quality characteristics in markets and other sales outlets.

**Keywords:** Traditional Meat Products, Shelf Life, Sucuk, Pastırma, Doner, Tantuni, Kavurma

## 1. INTRODUCTION

Turkey's geographical location and owned by different culinary cultures of each region with a variety of cultural and artistic values has a unique value (Boyraz, 2019). Meals form an important part of the culture which they belong to (Lopez-Guzman and Canizares-Sanchez, 2012). Turkey which houses the original features of the local cuisine with well-established and versatile culinary culture is among the most important cuisines in the world. New flavors developed in Seljuk and Ottoman palaces played a role in the diversification and shaping of Turkish cuisine today (Guler, 2010).

Traditional foods are specific products associated with a particular local area, region or country that are associated with the period or consumed frequently, usually transferred from one generation to another, produced as a part of the gastronomic heritage, with a special method, with little or no manipulation, and can be separated from other foods due to their sensory properties (Guerrero and et al., 2016; Cumhur, 2017). Varying according to each city in Turkey, it is located in a large number of local products (Boyraz, 2019). Turkish cuisine is famous throughout the world for meat dishes such as skewers and doner kebabs (Toygar and Baysal, 1993). In addition, there are various traditional meat products in Turkish cuisine such as kavurma (roasting), grilled kebabs, sucuk (fermented sausage), pastırma, and tantuni (Kılıç, 2009). These products may differ depending on the region they are produced, and may vary according to the production technique and raw materials (Kuşat, 2012; Kadanali and Dagdemir, 2016).

## 2. TURKISH TRADITIONAL MEAT PRODUCTS AND EFFECTIVE FACTORS ON THEIR QUALITY

### 2.1. Sucuk (Fermented Sausage)

Fermented sausage is a fermented meat product obtained by mixing meat and oil with salt, sugar, garlic, various spices and a small amount of other additives, filling them in natural or artificial cases and ripening under controlled climatic conditions (Dilber, 2012).

The differences between the results of microbiological and chemical load on the sausage sold in Turkey; It results from inadequate standardization procedures applied during processing, inadequate and variable technological and hygiene practices, and changing raw material quality and starting cultures (Erkmen and Bozkurt, 2004; Kok et al., 2006).

### 2.2. Pastırma

Pastırma is a cured and dried meat product that has not been heat treated. It's produced by applying drying, pressing and fenugreek processes on cured and washed whole meat that separated from cattle carcasses in accordance with special technology (TGK, 2019).

Pastırma is consumed in slices (Aksu et al., 2005). Sliced pastırma must be packaged and stored at low temperature to maintain quality properties. As a result of slicing pastırma, microbiological contamination may occur and the risk of spoilage increases (Gökalp et al., 1999; Aksu and Kaya, 2005). Changes such as color defect and deterioration occur due to improper preservation in sliced pastırma. Therefore, packaging is an essential process to extend the shelf life and maintain the quality of sliced pastırma (Wang et al., 1995; Wang, 2001; Aksu et al., 2005).

### 2.3. Kavurma (Roasting)

Kavurma is a meat product that is prepared by cooking beef or mutton together with salt and fats of the animal species from which meat is obtained (TGK, 2019).

The high amount of oil in the kavurma (30-40%) increases the risk of lipid oxidation in the product during storage and negatively affects the shelf life of the product (Aksu, 2006).

### 2.4. Doner kebab

The production of doner kebab is based on the principle of cooking the beef, lamb or poultry meat with fat that is shaped in rotary sticks after being marinated (TGK, 2019).

Doner kebab can be offered for consumption in restaurants as well as in markets as packed (TS, 2016; TGK, 2019). If doner production is not carried out under suitable conditions, it may cause food poisoning, as a favorable environment for microbial growth will occur. Pathogenic microorganisms can be inhibited by applying the cooking process with sufficient time and effective temperature to the raw doner meat (Acar, 1996; Oksuztepe and Beyazgul, 2014).

### 2.5. Tantuni

Tantuni is preferably consumed by cooking in a special pan after adding various vegetables, spices and oil using beef, mutton or chicken (Merdol, 2015; Selcuk and Agaoglu, 2019). Tantuni, which is very popularly consumed in different regions of our country, is among the traditional dishes of the Eastern Mediterranean Region (Yıldız et al., 2009; Yalçın and Can, 2013).

The hygiene of raw materials, spices and other additives used in the preparation of tantuni, equipment used, personnel hygiene, business sanitation, and improper applications in meat cooking can cause cross contamination and affect quality (Toprak, 2000; Tayar et al., 2015; Selçuk and Agaoglu, 2019).

## 3. STUDIES FOR INCREASING THE SHELF LIFE OF TURKISH TRADITIONAL MEAT PRODUCTS

Shelf life is defined as the physical, chemical and microbiological resistance time of a product to reach the consumer without any significant change (Gokmen and Oztan, 1995).

All of the basic procedures applied to increase the shelf life of foods are aimed at limiting or eliminating the factors that cause spoilage (Oztan, 1993; Gokmen and Oztan, 1995). Lipid oxidation and microbial contamination are among the main causes that cause deterioration in meat quality during storage and processing (Ertas et al., 1989; Gray et al. 1996; Ercoskun et al., 2006).

There are studies on different methods such as the addition of natural antimicrobial and antioxidant components, the use of starter cultures and probiotics, different packaging techniques and process modifications in order to prolong the shelf life of traditional meat products and provide functional features to the product. The results of some of these studies are given in the tables.

**Table 1. Addition of Natural Antimicrobial and Antioxidant Compounds**

| Product | Process | Results | References |
|---|---|---|---|
| Sucuk (Fermented Sausage) | Cranberry Extract 200/500/1000 ppm and control group 28 days storage at 4 °C. | It was determined that in increasing concentrations cranberry extract was successful in preventing lipid oxidation and help protect the color. | (Ergezer et al., 2018). |
| Sucuk (Fermented Sausage) | 10 months storage at -20 ºC using rosemary and whey powder | Lipid oxidation was less developed in the sample groups compared to the control group. | (Coronado et al., 2002). |
| Roasting | Addition of BHA and α-tocopherol at 50 and 100 ppm levels (4 °C/300 days) | It was determined that the most effective antioxidant was 100 ppm BHA followed by 100 ppm α-tocopherol. Moreover the color of the roast added 100 ppm BHA was better preserved and the lipid oxidation stability was higher during storage. | (Aksu and Kaya, 2005) |
| Kavurma (Roasting) | Storing the roasting containing 1.8% sage, 1.2% thyme and 1.2% ginger at 0 to 4 °C /120 days of storage | TBARS values of the control group were significantly higher than the samples added condiments. Sample with ginger was found to had the highest sensory evaluation scores and antioxidative activity compared to other samples. | (Kayaardi et al.,2005) |

**Table 2. Usage Starter Cultures and Probiotics**

| Product | Process | Results | References |
|---|---|---|---|
| Sucuk (Fermented Sausage) | The use of microorganisms (*P.acidilactici, L. plantarum ve S. Carnosus)* as starter cultures and to determine the effects of some commercially used additives on the quality of sucuk. | It has been reported that total amount of bacteria, yeast, mold and lipid oxidation were reduced. | (Bozkurt and Erkmen, 2007) |
| Pastırma | Potassium nitrate and commercial starter culture use (*Staphylococcus carnosus +Lactobacillus pentosus)* | The use of starter culture in production was effective on the total number of aerobic mesophilic, *Micrococcus / Staphylococcus* and lactic acid bacteria. In the samples using stater cultures, the general appreciation and *a** values were detected as high. | (Aksu and Kaya, 2002) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sucuk (Fermented Sausage) | Application of probiotics (*L. acidophilus* ve *B. lactis*) with vacuum or modified atmosphere packaging (50% $N_2$ + 50% $CO_2$) | It has been determined that lipid oxidation, total aerobic bacteria and *Micrococcus / Staphylococcus* were reduced. It has also been reported that *B. lactis* and *L. acidophilus* starter cultures can be used as a probiotic source in sausages. | (Kaya and Aksu, 2005). |

**Table 3. Different Packaging Techniques**

| Product | Process | Results | References |
|---|---|---|---|
| Pastırma | Investigation of microbiological and sensory properties of pastırma stored at -4, 0, 3 and 7 ° C, packaged with nitrogen gas or vacuum. | As the samples filled with nitrogen gas were stored at 7 ° C, the number of yeast and mold decreased. Packaging with nitrogen gas was detected more effective against yeast and mold formation. | (Laleye et al., 1984) |
| Doner Kebab (Anchovy Doner) | Vacuum packaging storage at 4 ± 1 °C for 63 days | The TBARS value reached the highest value (3.53 mg MDA / kg) on the 63rd day of storage and the sensory evaluation scores of Doner samples were reported to reach values that cannot be consumed. | (Izci et al., 2015). |
| Pastırma | Application of different storage temperatures (4 and 10 ° C) and storage time (0, 30, 60, 90, 120 and 150 days) Packaging in MAP (%50 $CO_2$ + %50 $N_2$) | It was determined that interactions between storage time and storage temperature had an effect on pH, *a* * values and total aerobic bacteria, lactic acid bacteria, *Micrococcus / Staphylococcus* numbers. Yeast and mold counts were highest during the first storage period and decreased during storage. | (Aksu and Kaya, 2005) |

**Table 4. Process Modifications**

| Product | Process | Results | References |
|---|---|---|---|
| Doner kebab | Investigation of oxidation development with batch or continuous vacuum tumbling with the addition of SodiumTripolyphosphate (0% and 0.25%) to marinating | The addition of sodium tripolyphosphate reduced lipid oxidation in the samples. Higher oxidation development was detected in the samples with batch vacuum tumbling. | (Soncu et al., 2014) |
| Doner kebab | Comparison of microbiological quality of samples cooked by Sous vide (SVD) and traditional method (TCD) | It was determined that total mesophilic aerobic bacteria, lactic acid bacteria, total psychrophilic aerobic bacteria, yeast and mold counts were higher in TCD samples than SVD. | (Soncu et al., 2016) |
| Pastırma | Holding with fenugreek at different periods of time (12, 24 and 48 hours) | Pastırma holding with fenugreek for 48 hours had better microbiological quality compared to other pastırma samples. | (Kok, 2001) |
| Sucuk (Fermented Sausage) | Investigation of the performance of mechanically separated boneless chicken meat protein (MDCM-P) coatings containing 1.5% Thyme | It was determined that weight loss, pH, TBARS, total viable and psychrotrophic bacteria count increased, *a* * and *b* * values and | (Saricaoglu and Turhan, 2019) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | (TEO) or 1.5% clove essential oils (CEO) on heat-treated fermented sausages (sucuk) at 4°C for 45 days. | water activity decreased with storage period. These changes were slowed down with coating applications containing essential oils, but the slowest changes were in fermented sausages (sucuk) covered with MDCM-P solution containing 1.5% CEO. | |

## 4. CONCLUSION

It is important to ensure a healthy, sustainable and wide-ranging transfer of our traditional foods to future generations.There are major deficiencies in Turkey, especially in the production of traditional meat products in healthier, hygienic conditions and distribution to high number of consumers. In the studies carried out; It has been concluded that optimizing process conditions, benefiting from the antioxidant and antimicrobial properties of natural additives, the use of starter cultures and probiotics, different packaging techniques will be beneficial for extending the shelf life of traditional meat products and preventing food poisoning.

More research is needed in order to reaching high number of consumers of traditional Turkish meat products while having a certain shelf life and maintaining their quality characteristics in markets and other sales outlets.

## 5. REFERENCES

Acar MS 1996. Kasaplık hayvan etleri ve tavuk etinden yapılan döner kebapların mikrobiyolojik kalitesinin karşılaştırmalı araştırması, Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul.

Aksu MI, Kaya M Ockerman HW 2005. Effect of modified atmosphere packaging on the shelf life of Pastırma produced from frozen/thawed meat. Journal Muscle Foods.

Aksu MI, Kaya M 2005. Effect of storage temperatures and time on shelf-life of sliced and modified atmosphere packaged Pastırma, a dried meat product, produced from beef. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(8): 1305-1312.

Aksu Mİ, Kaya M 2005. The effect of α-tocopherol and butylated hydroxyanisole on the colour properties and lipid oxidation of kavurma, a cooked meat product. Meat Science, 71: 277-283.

Aksu Mİ, Kaya M 2002. Potasyum Nitrat ve Starter Kültür Kullanılarak Üretilen Pastırmaların Bazı Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özellikleri. Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi, 26: 125-132.

Aksu Mİ 2006. Kavurma'nın Peroksit Sayısı ve Serbest Yağ Asidi Miktarı Üzerine Tokoferol ve Farklı Depolama Şartlarının Etkisi, Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu

Boyraz M 2019. Coğrafi İşaretli Ürünler: Afyonkarahisar1.

Bozkurt H, Erkmen, O 2007. Effects of some commercial additives on the quality of sucuk (Turkish dry-fermented sausage). Food Chemistry, 101: 1465-1473.

Bozkurt H, Erkmen O 2004. Effects of temperature, humidity and additives on the formation of biogenic amines in sucuk during ripening and storage periods. Food Science and Technology İnternational, 10 (1): 21-28.

Coronado SA, Trout GR, Dunshea FR, Shah NP 2002. Antioxidant effects of rosemary extract and whey powder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. Meat Science, 62: 217-224.

Cumhur Ö 2017. Geleneksel Gıdaların Endüstriyel Üretime Aktarılması. 1. Uluslararası Turizmin Geleceği Kongresi: İnovasyon, Girişimcilik ve Sürdürülebilirlik (Futorism 2017), pp. 28-30.

Dilber A 2012. Koyun mekanik ayrılmış tavuk ve hindi etlerinin sucuğun bazı fizikokimyasal tekstürel ve duyusal özellikleri üzerine etkisinin optimizasyonu (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

Ergezer H, Gökçe R, Elgin Ş, Akcan T 2018. Kızılcık (Cornus mas L.) ekstraktı kullanımının sucuk kalite karakteristikleri üzerine etkisi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 24(7): 1376-1381.

Ertaş AH, Kolsarıcı N, Halkman K Soyer A 1989. Sucukların bazı kalite kriterlerine sodyum nitrat ve sodyum tripolifosfatların etkisi. Gıda, 14(6): 393-400.

Ercoşkun HY, Ertaş AH 2006. Isıl işlem uygulanarak üretilen sucukların bazı kalite özelliklerine fermentasyon süresinin etkileri (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı)

Gökalp HY, Kaya M, Zorba O 1999. Technology of pastırma and some other dried products, in Engineering of Meat Products Processing (in Turkish) (3rd edn). Publication no 786. Atatürk University, Faculty of Agriculture, Erzurum, pp. 309– 339.

Gökmen V, Öztan, A 1995. Gıdaların raf ömrünü etkileyen faktörler ve raf ömrünün belirlenmesi. Gıda, 20(5).

Güler S 2010. Türk mutfak kültürü ve yeme içme alışkanlıkları. Dumlupınar Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi, 26(S 1): 24-30.

Guerrero L, Claret A, Verbeke W, Sumont-Rosse C, Hersleth M 2016. Innovation in traditional food products: Does it make sense. In: Innovation Strategies in Food Industry: Tools for Implementation, ed. Charis M. Galanakis, Elsevier Academic Press, pp. 77-89.

Gray JI, Gomaa EA, Buckley DJ 1996. Oxidative quality and shelf-life of meats. Meat Science, 43: 111-123.

İzci L, Bilgin Ş, Günlü A, Çetinkaya S, Diler A, Genç İY, Bolat Y 2015. Hamsi balığı (Engraulis Encrasicolus) dönerinin soğuk depolama sırasındaki kalite değişimleri. Tarih Bilimleri Dergisi, 22: 360-369.

Kadanali E, Dağdemir V 2016. Tüketicilerin yöresel gıda ürünleri satın alma istekliliği.

Kaya M, Aksu MI 2005. Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on some quality characteristics of sliced 'sucuk' produced using probiotics culture. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85 (13): 2281-22.

Kayaardi S, Durak F, Kayacier A, Kayaardi M 2005. Chemical characteristics of kavurma with selected condiments. International Journal of Food Properties, 8(3): 513-520.

Kilic B 2009. Current trends in traditional Turkish meat products and cuisine. LWT-Food Science and Technology, 42(10):1581-1589.

KÖK F 2001. Farklı Sürelerde Çemende Bekletmenin Bıyıklı Balık (Barbus esocinus) Pastırmasına Olan Etkisi (Doktora Tezi). F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Kok F, Oksuztepe G, Ilhak OI, Patir BAHRI 2006. Chemical and microbiological quality of fermented sausages made from camel meat. Medycyna Weterynaryjna, 62(8): 893-896.

Kuşat N 2012. Bölgesel Kalkınmada Geleneksel Gıda Ürünlerinin Rolü ve Geleneksel Gıdalarda İnovasyon Belirleyicileri Üzerine Bir Çalışma: Afyon örneği. Yönetim ve Ekonomi: Celal Bayar Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi, 19(2): 261-275.

Laleye LC, Lee BH, Simard RE, Carmichael L, Holley RA, 1984. Shelf Life of Vacuum-Or Nitrogen-Packed Pastrami: Effects of Packaging Atmospheres, Temperature And Duration of Microflora Changes. Journal of Food Science, 49: 827-831.

Laleye LC, Lee BH, Simard RE, Carmichael L, Holley RA, 1984. Shelf Life Of Vacuum-Or Nitrogen-Packed Pastrami: Effects Of Packaging Atmospheres, Temperature and Duration of Storage On Physichochemical And Sensory Changes. Journal of Food Science, 49: 832- 837.

Lopez-Guzman T, Sanchez-Canizares S 2012. Gastronomy, Tourism and Destination Differentiation: A Case Study in Spain. Review of Economics and Finance, 1: 63-72.

Merdol TK 2015. Toplu Beslenme Servisi (TBS) Sağlıklı Yönetim Rehberi. 1. Baskı, Bölüm 2, Ankara: Hatiboğlu Yayınevi, pp. 41- 69.

Öksüztepe G, Beyazgül P, 2014. Elazığ'da satılan pişmiş et ve tavuk dönerlerin mikrobiyolojik kalitesi. F.Ü. Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 28 (2): 65-71.

Öztan A 1993. Et Bilimi ve Teknolojisi. H.Ü. Müh. Fak. Yay. No:19, Ankara.

Saricaoglu FT, Turhan S 2019. Performance of mechanically deboned chicken meat protein coatings containing thyme or clove essential oil for storage quality improvement of beef sucuks. Meat science, 158: 107912.

Selçuk Ü, Ağaoğlu S 2019. The Microbiological Quality of Tantuni. Turkish Journal of Veterinary Research, 3(1): 37-44.

Soncu ED, Kolsarıcı Nuray K, İ. Bektaş G. Turan Akoğlu 2014. The effects of vacuum tumbling combined with sodium tripolyphosphate on lipolytic and oxidative changes in beef döner. Gıda 39.5: 259-266.

Soncu ED, Haskaraca G, Kolsarici N 2016. Microbiological, physicochemical, and sensorial characteristics of sous vide Doner. In 62 International Congress of Meat Science and Technology, pp. 14-19.

Tayar M, Korkmaz NH, Özkeleş HE 2015. Beslenme İlkeleri. 3. Baskı, Bursa: Dora Basım.

Toprak Y 2000. Implementation of The HACCP System in The School of Land Warfare. Master's Thesis, Ankara: Ankara Univ, Health Sciences Institute

Toygar K (ed.), Baysal A 1993. Türk Yemek Kültüründe Değişmeler, Beslenme ve Sağlık Yönünden Değerlendirme. Türk Mutfak Kültürü Üzerine Araştırmalar. Türk Kültürünü Araştırma ve Tanıtma Vakfı-3, Ankara. pp. 12-20.

T.C. Resmi Gazete 2019. Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et Ürünleri Tebliği Tebliğ No: 2018/52, Sayı:30670.

TSE 2016. Döner Eti-Pişmemiş. TS 11859. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Yalçın H, Can ÖP 2013. Tüketime Hazır Bazı Et Yemeklerinin Mikrobiyolojik Kaliteleri. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 10 (1).

Yıldız A, Tuna Ö, Değirmenci Y 2009. Mersin İli Geleneksel Ürünleri. İkinci Geleneksel Gıdalar Sempozyumu. Mayıs, pp. 27-29.

Wang FS, Jiang YN and Lin CW 1995. Lipid and cholesterol oxidation in Chinese-style sausage using vacuum and modified atmosphere packaging. Meat Science, 40: 93– 101.

Wang FS 2001. Lipolytic and proteolytic properties of dry-cured boneless hams ripened in modified atmospheres. Meat Science 59: 15– 22.

# The variation in the size fractionation of chlorophyll a with phytoplankton biomass along the Dardanelles Strait.

Esra KOÇUM

Onsekiz Mart Üniversitesi, Faculty of Arts & Sciences. Dept. of Biology. Ecology Section, Çanakkale, Türkiye

*Corresponding author e-mail: kocuej@hotmail.com

## Abstract

An analysis of partitioning of chlorophyll a with bulk chlorophyll a was performed to find out variation of size structure of phytoplankton with its bulk biomass using pooled data sets collected at coastal sites along the Dardanelles Strait in two different time periods. The bulk chlorophyll a varied between 0.43 – 10.41 µg chl a $L^{-1}$ with an average, first quartile, median and a third quartile values of 1.95 ± 0.33 µg chl a $L^{-1}$, 0.65 µg chl a $L^{-1}$, 0.92 µg chl a $L^{-1}$, 2.26 µg chl a $L^{-1}$; respectively. The average concentrations of chlorophyll a contained within the micro-, nano- and pico--plankton size fractions with their corresponding standard error values were; 0.64 ± 0.19 µg chl a $L^{-1}$, 0.50 ± 0.07 µg chl a $L^{-1}$ and 0.28 ± 0.04 µg chl a $L^{-1}$ displaying clear differences. Though the relative contributions of micro- and nano-plankton fractions were equal (*ca.* 38 ± 1.91 %) while that of picoplankton was 25.35 ± 1.96 %. The statistical analysis of the relation between the biomass and size structure of phytoplankton revealed the following points: 1) the response of relative contribution of microplankton fraction to phytoplankton biomass was only linear within the range of 1.19 µg chl a $L^{-1}$ to 10.41 µg chl a $L^{-1}$ (max.), 2) the distribution of relative contribution of nanoplankton with phytoplankton biomass was gaussian, 3) the change in the relative share of picoplankton with phytoplankton biomass fit into an inverse first order polynomial function. In conclusion; a shift occurs from a picoplankton dominated phytoplankton commmunity to a nano- and micro-plankton dominated one at bulk chlorophyll a concentrations > 1 µg $L^{-1}$. Therefore the change in phytoplankton biomass size structure and associated changes in the ecosystem can be predicted by using bulk chlorophyll a concentrations in the study sites.

**Key words**: biomass, Dardanelles, phytoplankton, size-structure.

## INTRODUCTION

Phytoplankton form the base of all marine food webs contributing nearly half of the global net primary production (Field et al., 1998). They have crucial roles in the cycling of elements and downward transport of particulate matter to the ocean's interior (ex., Cerino et al., 2019). In pelagic ecosystems they are the major autotrophs hence directly interact with abiotic factors like temperature, inorganic nutrient concentrations, pH changes. making them convenient indicators of environmental change (ex., Garmendia et al., 2013). There are various phytoplankton related traits used as environmental indicators, for instance chlorophyll a (chl *a*) biomass is frequently used an indicator of trophic status, particularly in the assesment of nutrient enrichment in coastal marine ecosystems (ex., Smith, 2006). The partitioning of phytoplankton biomass among different sized cells of phytoplankton species is called phytoplankton biomass size structure and also considered as a crucial ecological indicator (Brewin et al., 2019). It is modified by changes in light intensity, temperature, nutrients, activity and feeding preferences of grazers and turbulence (Finkel, 2001; Shiomoto, 2008; Maranon et al., 2001; Fuchs and Franks, 2010; Poulin and Franks, 2010; Zhou et al., 2010; Kiørboe, 1993) in a predictable manner. The changes in phytoplankton size structure influence the trophic transfer efficiency of organic matter and the strength of biological pump (ex., Irwin et al., 2006; Falkowski et al., 1998). Therefore phytoplankton biomass size structure enhance the predictions on the structure and functioning of marine ecosystems under anthropogenic and climate related changes (Finkel et al., 2010). The study of the statistical relation between size structure and bulk biomass of phytoplankton helps to predict size structure of phytoplankton communities from its bulk biomass, hence the structure and functioning of the marine ecosystems. There are emprical and modelling studies that attempt to explain the variation in the size structure of phytoplankton with its bulk biomass, majority of which showed that the phytoplankton bulk biomass increases with the addition of biomass to the largest size class and the relative contribution of picoplankton

decreases with increases in bulk phytoplankton biomass while nanoplankton contribution peaks at intermediate levels, though this pattern has not been confirmed for every location studied (ex.; Raimbault et al., 1988; Chisholm, 1992; Li, 2002; Irigoien et al., 2004; Goericke, 2011). Here an analysis of such relation has been presented for a strait ecosystem, the Dardanelles, Çanakkale using published data to find out to how the variation in the size structure of phytoplankton is related to its bulk biomass.

## MATERIALS AND METHOD

The data analysed in the study were collected as parts of two independent studies carried out four coastal locations along the Dardanelles during two periods between August 2009 and August 2010 and between May 2015 and June 2016. The data, detailed information on study locations sample collection and analysis were presented in Kocum and Sutcu (2014) and Kocum (2020). The data from two studies were pooled for the statistical analysis. The data transformations were made according to Zar (1984). The relations between the biomass and relative contribution (RC) of each size fraction to bulk phytoplankton biomass (BPB) was analysed by: 1) calculating the mean values of the variables that correspond to 1st, 2nd, 3rd and 4th quartile ranges of BPB, 2) using the pairwise Pearson correlation coefficients among the variables (SPSS, 20.00), 3) producing scatter plots and the regression analysis of size fractions on BPB (Sigma Plot 10.0, SPSS Inc., USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

The bulk phytoplankton biomass varied between 0.43 – 10.41 µg chl a $L^{-1}$ with an average, first quartile, median and a third quartile values of 1.95 ± 0.33 µg chl a $L^{-1}$, 0.65 µg chl a $L^{-1}$, 0.92 µg chl a $L^{-1}$, 2.26 µg chl a $L^{-1}$; respectively. The microplankton contained the highest amount of chl *a* followed by nanoplankton whereas the relative contributions of the micro- and nanoplankton fractions were the same and picoplankton made the lowest contribution to total chl *a* (Table 1).

**Table 1: Descriptive statistics of variables used in the data analysis (BPB:bulk phytoplankton biomass, MPB:microplankton biomass, NPB: nanoplankton biomass, PPB: picoplankton biomass, MP:microplankton, NP:nanoplankton, PP:picoplankton, DIN:dissolved inorganic nitrogen, Q: quartile, CV: coefficient of variation, IQR : interquartile range).**

| Variable | Mean | SE | CV(%) | Q1 | Q2 | Q3 | IQR | Min. | Max. | N |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BPB (µg chl a $L^{-1}$) | 1.95 | 2.28 | 116.56 | 0.65 | 0.92 | 2.26 | 1.62 | 0.43 | 10.41 | 48 |
| MPB (µg chl a $L^{-1}$) | 0.64 | 0.19 | 202 | 0.14 | 0.26 | 0.58 | 0.44 | 0.05 | 8.69 | 448 |
| NPB (µg chl a $L^{-1}$) | 0.50 | 0.07 | 97.71 | 0.13 | 0.33 | 0.77 | 0.64 | 0.04 | 2.28 | 48 |
| PPB (µg chl a $L^{-1}$) | 0.28 | 0.04 | 99.39 | 0.13 | 0.22 | 0.30 | 0.17 | 0.02 | 1.40 | 47 |
| RA of MP (%) | 37.52 | 1.92 | 35.36 | 27.57 | 35.06 | 46.88 | 19.30 | 10.70 | 79.30 | 48 |
| RA of NP (%) | 37.65 | 1.92 | 35.31 | 26.56 | 36.33 | 48.20 | 21.65 | 10.21 | 63.08 | 48 |
| RA of PP (%) | 25.36 | 1.96 | 53 | 16.34 | 22.95 | 33.50 | 17.15 | 3.59 | 66.03 | 47 |

The biomass in microplankton showed the greatest variation suggesting that the changes in BPB was mainly due to this size fraction. The variation in the biomass values of nano- and picoplankton was much smaller and similar to each other, in magnitude. The variations in the RC of each size fraction were much smaller than those in their biomasses and the picoplankton was the size fraction with the highest variation in its relative contribution while the relative contributions of other two size fractions had smaller and similar variations (Table 1).

**Table 2: The significant Pearson correlation coefficients among varables ($^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$). (The sample sizes and abbreviations are as in Table 1).**

| | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (1) BPB | .81** | .85** | .76** | | | -.34* | .48** | .50** |
| (2) MPB | . | .77** | .67** | .50** | | -.44** | .40** | .51** |
| (3) NPB | | | .67** | | | -.48** | .33* | .43** |
| (4) PPB | | | | | | . | .30* | .38* |
| (5)RC of MP (%) | | | | | -.40** | -.49** | | .36* |
| (6)RC of NP (%) | | | | | | -.40** | | |
| (7)RC of PP (%) | | | | | | | | |
| (8) $NO^{3-}$ | | | | | | | | .63** |
| (9) $Si(OH)_4$ | | | | | | | | |

The biomass and RC of microplankton significantly correlated and the former negatively correlated to RC of picoplankton (Table 2), implying the contribution of picoplankton did not vary with its biomass and the microplankton fraction had a dominant affect on the size structure of phytoplankton. The biomass of all size fractions and the relative contributions of micro- and nanoplankton had significant positive correlations with BPB while there was a negative corrrelaton between RC of picoplankton and BPB (Table 2).

**Table 3: The mean values of variables that fall into 1st ($Q_1$). 2nd ($Q_2$). 3th ($Q_3$) and 4th ($Q_4$) quartile ranges of BPB (µg chl a $L^{-1}$). (The sample sizes and abbreviations are as in Table 1)**

| Variables | $Q_1$ (0.43-0.64) | $Q_2$ (0.65-0.89) | $Q_3$ (0.95-2.15) | $Q_4$ (2.30-10.41) |
|---|---|---|---|---|
| MPB (µg chl a $L^{-1}$) | 0.14 | 0.28 | 0.43 | 1.70 |
| NPB (µg chl a $L^{-1}$) | 0.11 | 0.26 | 0.61 | 1.03 |
| PPB (µg chl a $L^{-1}$) | 0.18 | 0.16 | 0.23 | 0.55 |
| RC of MP (%) | 35.38 | 37.91 | 34.34 | 42.46 |
| RC of NP (%) | 27.59 | 38.70 | 46.05 | 38.25 |
| RC of PP (%) | 40.39 | 23.39 | 19.61 | 19.29 |
| $NH_4^+$ (µM) | 22.34 | 30.69 | 41.32 | 20.29 |
| $NO_3^-$ (µM) | 102.25 | 116.44 | 344.50 | 529.90 |
| $PO_4^{3-}$ (µM) | 1.18 | 2.80 | 3.02 | 2.89 |
| $Si(OH)_4$ (µM) | 10.09 | 21.96 | 34.00 | 68.79 |

The mean values for the biomass and RC of size fractions that falls into different quartiles of BPB showed the mean values of the micro- and nanoplankton biomass displayed an increase from first to fourth quartile ranges while the opposite was true for RC of picoplankton (Table 3). The mean values for $NO_3^-$ and $Si(OH)_4$ also increased from first to fourth quartile ranges of BPB. The highest values of RC of nanoplankton, $NH_4^+$ and $PO_4^{3-}$ co-occurred with BPB values that are in the third quartile. The RC of microplankton was highest in the last quartile of BPB values (Table 3).

The response of each size fraction to phytoplankton biomass was significantly linear. The slopes of biomass values of microplankton and nanoplankton – BPB relations were similar and bigger than that of picoplankton biomass implying that the micro and nanoplankton increased more rapidly with the BPB (Figure1). The relation of RC of microplankton fraction to BPB was not linear through the data range but became linear at

BPB levels ≥ 1.19 µg chl *a* $L^{-1}$ (Figure 2). The distribution of relative contribution of nanoplankton with BPB biomass was Gaussian with highest nanoplankton relative contribution occurring in the 3rd quartile (0.95-2.15 µg chl a $L^{-1}$) of BPB (Table 3). The change in the relative share of picoplankton with phytoplankton biomass fit into an inverse first order polynomial function. This means picoplankton dominates (40 %) the phytoplankton community at low biomass levels that corresponds to 1st quartile of the BPB data (≤ 0.64 µg chl a $L^{-1}$).

## CONCLUSIONS

There was a clear pattern of change in the partitioning of chla among micro-, nano- and picoplankton size fractions in the analysed data set. Picoplankton dominated the phytoplankton when chl *a* was < 0.64 µg $L^{-1}$ and phytoplankton biomass increases beyond 1.19 µg $L^{-1}$ level occurred by the addition of larger sized phytoplankton. Therefore it is possible to infer size structuring of phytoplankton community from measurements of BPB in the study sites. Since BPB levels related to $NO_3^-$ and $Si(OH)_4$ it is also possible to predict the nutrient levels that cause a shift in phytoplankton community size structure from one dominated by picoplankton to one dominated by microplankton.

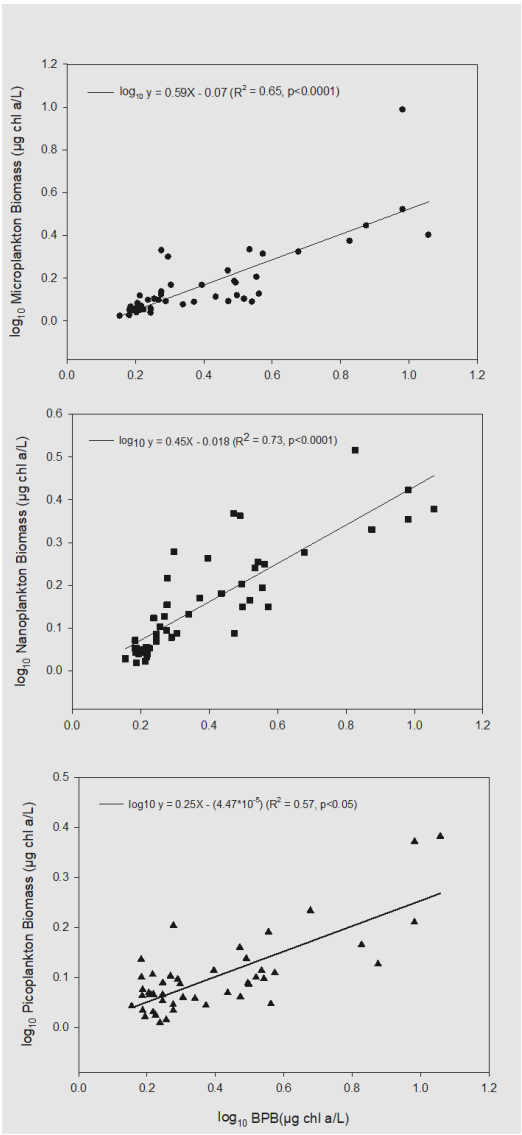



Figure 1: Relationships between the biomass of micro-, nano- and picoplankton with BPB.

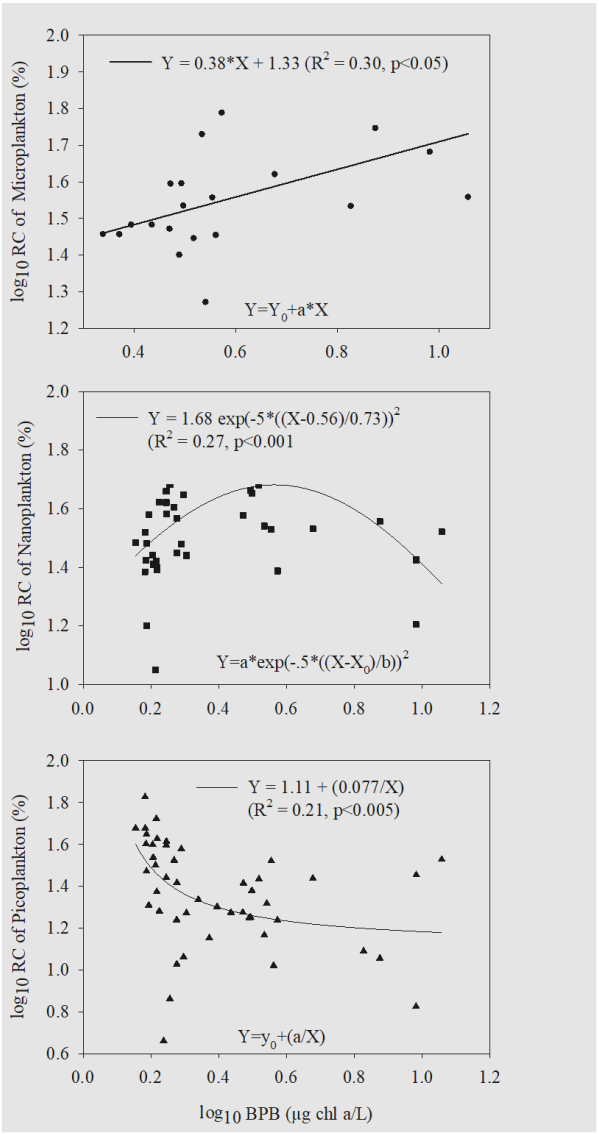



Figure 2: The regression analysis of RC of size fractions on BPB.

Literature Cited:

Brewin RJW, Morán XAG, Raitsos DE, Gittings JA, Calleja MLl, Viegas M, Ansari MI, Al-Otaibi N, Huete-Stauffer TM and Hoteit I (2019) Factors Regulating the Relationship Between Total and Size-Fractionated Chlorophyll-a in Coastal Waters of the Red Sea. Front. Microbiol. 10:1964.

Cerino F, Fornasaro D, Kralj M, Giani M, Cabrini M (2019) Phytoplankton temporal dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea (Mediterranean Sea) from 2010 to 2017. In: Mazzocchi MG, Capotondi L, Freppaz M, Lugliè A, Campanaro A (Eds) Italian Long-Term Ecological Research for understanding ecosystem diversity and functioning. Case studies from aquatic, terrestrial and transitional domains. Nature Conservation 34: 343–372.

Chisholm, S. W. (1992). "Phytoplankton size," in Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea, eds P.G. Falkowski and A.D.Woodhead (New York, NY: Springer), 213–237.

Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. Science, 281, pp. 200–206.

Field C, Behrenfeld M, Randerson J, Falkowski P (1998) Primary productivity of biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. Science 281: 237-240

Finkel ZV, Beardall J, Flynn KJ, Quigg A, Rees TAV, Raven JA (2010) Phytoplankton in a hangicng world: cell size and elemental stoichiometry. J. of Plankton Res. 32:119–137.

Finkel ZV (2001). Light absorption and size scaling of light-limited metabolism in marine diatoms. Limnology and Oceanography, 46: 86–94.

Fuchs HL,Franks PJS (2010). Plankton community properties determined by nutrients and size-selective feeding. Marine Ecology Progress Series 413: 1–15.

Garmendia M, Borja A, Franco J, Revilla M(2013). Phytoplankton composition indicators for the assessment of eutrophication in marine waters: present state and challenges within the European directives. Mar. Pollut. Bull. 66: 7–16.

Goericke R (2011). The size structure of marine phytoplankton communities. What are the rules? CalCOFI Reports 52:198-204.

Irigoien X, Huisman J, Harris (2004) Global biodiversity patterns of marine phytoplankton and zooplankton. Nature 429: 863–867.

Irwin AJ. et al. (2006). Scaling-up from nutrient physiology to the size-structure of phytoplankton communities. Journal of Plankton Research, 28, pp. 459–471.

Kiørboe T (1993). Turbulence, phytoplankton cell size and the structure of pelagic food webs. dvances in Marine Biolog, 29: 1–72.

Kocum E (2020) Autotrophic nanoplankton dynamics is significant on the spatio-temporal variation of phytoplankton biomass size structure along a coastal trophic gradient. Regional Studies in Marine Science 33:100920.

Kocum E , Sutcu A (2014) Analysis of variations in phytoplankton community size-structure along a coastal trophic gradient. http://dx.doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-12-00045.1

Li WKW (2002) Macroecological patterns of phytoplankton in the northwestern North Atlantic Ocean. Nature 419: 154–157.

Maranon EP, Holligan , Barciela R, Gonzalez N, Mourino B, Pazo MJ,Varela M (2001) Patterns of phytoplankton size-structure and productivity in contrasting open ocean environments. Mar. Ecol. Prog. Ser. 216: 43–56. http://dx.doi.org/10.3354/meps216043.

Poulin FJ, Franks PJ (2010). Size-structured planktonic ecosystems: constraints, controls and assembly instructions. Journal of Plankton Research, 32 (8): 1121–1130.

Raimbault P, Rodier M, Taupier-Letage I (1988). Size fraction of phytoplankton in the Ligurian Sea and the Algerian Basin (Mediterranean Sea): Size distribution versus total concentration. Mar. Microb. Food Webs 3:1–7.

Shiomoto A (2008). Photosynthetic responses to the temperature of size-fractionated phytoplankton in the winter time north-western Pacific. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 89(2), 265–268.

Smith VH (2006). Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and phosphorus enrichment. Limnol. Oceanogr. 511 (2): 377–384.

Zar, J.H., 1984. Biostatistical Analysis Englewood Cliffs. Prentice Hall, New Jersey.

Zhou M, Carlotti F, Zhu Y (2010). A size-spectrum zooplankton closure model for ecosystem modelling. Journal of Plankton Research, 32(8), 1147–1165.

# Food-based protein nanofibers produced by electrospinning

Atike Ince Yardimci[1] and Özgür Tarhan[2,*]

[1]Technology Transfer Office, Usak University Usak 64000, Turkey
[2]Department of Food Engineering, Usak University Usak 64000, Turkey

*corresponding author e-mail: ozgur.tarhan@usak.edu.tr

## Abstract

Electrospinning is an electro hydrodynamic process of producing fiber micro/nanoparticles from polymers/biopolymers. A polymeric solution is exposed to high voltage to form fibers as it stretches along the surface of collector panels. Resultant nano scale fibers has high surface to volume ratio, porous nature and special mechanical properties making them useful for different applications such as encapsulation of active agents and scaffolding for tissue engineering. Food proteins are natural biopolymers used safely for various purposes in food industry. Recently, the concerns arisen regarding the use of synthetic polymers due to their health risks potential, the use of safe biopolymers have gained more attention. Collagen, gelatin, whey, soy, zein and casein proteins are commonly used ones for fabrication of protein nanofibers. Since compact globular nature, and quaternary and tertiary structure of proteins may prevent pulling of their polypeptide chains during electrospinning, those proteins are needed to be dissolved acids and denatured. In order to enhance electrospinning ability proteins can also be mixed with other natural carrier polymers or crosslinkers. PVA and PEO are widely used carrier polymers, whereas genipin and glutaraldehyde are more commonly used crosslinkers. Protein based nanofibers can be used for encapsulation of bioactive agents such as phenolics, antimicrobials and colorants, thus providing benefits for packaging of food products. Additionally, they can offer safe use and functionality for health by carrying and controlled release of drug materials.

**Keywords:** electrospinning, food proteins, nanofibers.

## INTRODUCTION

Electrospinning is a simple and robust synthesis method for the fabrication of long organic fibers based on high electrical fields. It is a cost effective and flexible method which utilize electrically charged jet of a polymer solution for production of fibers at micro and nanoscale in diameter (Prabaharan, Jayakumar et al. 2011). Fibers obtained by electrospinning method possess many structural and functional advantages. They show have an extremely high surface to volume ratio and so they have been found use in many application area such as catalysis (Formo, Lee et al. 2008), tissue engineering (Ince Yardimci, Aypek et al. 2019), textile (Dhineshbabu, Karunakaran et al. 2014), filtration (Shabafrooz, Mozafari et al. 2014, Sundarrajan, Tan et al. 2014), and food technology (Torres-Giner 2011). However, electrospun nanofiber use in food technology has still been remained less explored. In this review, a brief discussion on the potential use of electrospun protein nanofibers and their potential food applications are presented.

## ELECTROSPINNING

Electrospinning is a technique which utilizes electrostatic forces in order to produce fibers. Electrospinning setup mainly consists of three parts, and these are a DC high voltage supply which is required a capacity of tens of kVs, a syringe pump, and a grounded collector with different geometries (Dosunmu, Chase et al. 2006). In process, the high voltage is generated between a negatively charged syringe and a grounded collector plate. Polymer solution is filled into the syringe and then the syringe is subjected to the high voltage and an electric charge is created onto the polymer solution drop at the tip of the syringe. When electric field reaches to a sufficient value and the electrostatic charge becomes larger than the surface tension of the polymer solution drop, the solvent evaporates and the drop stretches as a Taylor cone. A charged jet is ejected from the tip of the Taylor cone and this jet displays an unstable and fast way till the collector. At the last step, solid polymer

fibers deposited on the grounded collector (Deitzel, Kosik et al. 2002). In electrospinning process solution properties, process factors, and ambient conditions are the main parameters affected the mechanics of the fiber formation and fiber properties (Sill and von Recum 2008). Solution properties are solution concentration, viscosity, conductivity, and surface tension. Process paramerters consist of applied voltage, distance between the syringe and the collector, emitting electrode polarity, and solution flow rate. Temperature, humidity and velocity of the air are the ambient conditions affected fiber formation (Casper, Stephens et al. 2004).

## PROTEIN BASED ELECTROSPUN MATERIALS

In recent years, electrospinning of natural biopolymers such as polysaccharides, proteins, DNA, and their blends with other polymers have been widely investigated because of their biodegradable, biocompable, and renewable properties (Schiffman and Schauer 2008). Commonly used proteins for electrospinning are soy protein, whey protein, zein, geletin, collagen and casein. Among them some proteins for example soy and whey proteins can only be electrospun along with a co-polymer to achieve the fiber form. Utilized biopolymers both provide the spinnability of proteins and they enhace the mechanical properties of the resulting electrospun nanofibers such as tensile strength (Kriegel, Arrechi et al. 2008). Poly(ethylene) oxide (PEO) (Xu, Jiang et al. 2012, Sullivan, Tang et al. 2014) and polyvinyl alcohol (PVA) (Yang, Li et al. 2007, Cho, Nnadi et al. 2010, Cho, Netravali et al. 2012, Huang, Hu et al. 2016) are the most common synthetic polymers with proteins in electrospinning process.

Proteins are divided into two main groups; plant proteins and animal proteins. Zein, soy protein, gluten, and sun flower proteins are some of the well-known plant proteins which could be utilized for different food applications in fiber forms. Cho et al. (Cho, Netravali et al. 2012) synthesized soy protein isolate (SPI)/poly vinyl alcohol (PVA) hybrid electrospun nanofibers with different SPI/PVI ratios. Their results indicated that at the same SPI content, a higher pH level of the solution increased the denaturation of the protein and thinner fibers formed, leading to substantial reduction in the mechanical strength. SPI/PVA electrospun nanofibers were suggested as eco-friendly filtration materials (Fang, Zhu et al. 2016). SPI was also electrospun with poly(ethylene oxide) (PEO) and anthocyanin-rich red raspberry (ARRE) extract (Wang, Marcone et al. 2013). Variations in the physicochemical attributes of SPI nanofiber mats were investigated as a function of adding ARRE before and after protein denaturation. ARRE addition after SPI denaturation imparts fiber forming solutions with higher level of bioactive anthocyanins and a greater antibacterial activity against ***Staphylococcus epidermidis.*** anthocyanin-rich plant extracts are appropriate biological ingredients to create novel active/functionalized SPI-based nanomaterial in food systems. Zein is electropun with also gelatin as a co-polymer with the w/w:1/1 ratio and allopurinol was encapsulated into the glucose cross-linked zein/gelatin nanofibers (Deng, Li et al. 2019) and these nanofibers were reported a promising delivery system for hydrophobic bioactive molecules. Shanesaszadeh et al. studied electrospinning of sunflower protein isolate with PVA (Shanesazzadeh, Kadivar et al. 2018). Their contact angle data showed that heat treatment could make sunflower protein isolate/PVA nanofibers hydrophobic. FTIR analysis investigated denaturation of protein and interactions between protein and PVA after heat treatment.

The most common animal based protein which were reported in literature for electrospinning are whey protein, gelatin, casein, and silk fibroin. Sullivan et al. studied whey protein spinnability in order to utilize whey protein benefits with the desirable properties of nanofibers (Sullivan, Tang et al. 2014). They synthesized whey protein isolate (WPI) and beta-lactoglobulin were electropsun with PEO. PEO was incorporated into the solution to support nanofiber formation. They examined whey protein/PEO solution composition as high as 3/1 and obtained avarage fiber dimeters ranging from 312 to 690 nm. Solutions at acidic pH ($2 \leq pH \leq 3$) also support easy electrospinning because it could improve shelf life. An interesting result of this study indicated that whey protein/PEO nanofibers protected their fiber morphology as much as high at 100 $^{o}$C while the melting point of PEO is 60 $^{o}$C. Nanofibrous mats swell in water and retain a fibrous quality, therefore they were proposed for applications in regenerative medicine. In another study, whey protein was electropsun with 1% w/w PEO and potential use of nanofibers in food industry was investigated (Zhong, Mohan et al. 2018). Obtained nanofibers exhibited diameters in the range of 100 to 400 nm. Whey protein spinnability is related with the formation of aggrigates, either through hydration and interactions with neighbouring proteins, or interaction with the PEO.

## ELECTROSPUN MATERIALS FOR FOOD APPLICATIONS

Electrospun nanofibers find use in many applications in food industry in recent years. In this part, the use of electrospun materials in processing and preservations of foods will be highlighted. Three of the main food applications of electrospun materials are encapsulation of food bioactive compounds, immobilization of enzymes and food packaging.

Encapsulation is entrapping an active ingredient such as food bioactive molecules (e.g., antioxidants, essential fatty acids, vitamins) or living cells (e.g., probiotics) within a wall material such as carbohydrate polymers, proteins, lipids. Electrospinning process is a promising method for food bioactive encapsulation since it is a feasible method to produce dry, foodgrade and nanoscaled materials with high encapsulation efficiencies. Another important advantage of electrospinning for encapsulation is its operation parameters, electrospinning process takes place at ambient temperature and atmospheric pressure (Vega-Lugo and Lim 2009). Natural biopolymers, proteins and polysaccharides electrospun nanofibers are widely utilized for encapsulation due to their controlled and continuous release properties (Matalanis, Jones et al. 2011). Common electrospun proteins for encapsulation are WPI, SPI, egg albumen, collagen, gelatin, zein and casein.

Enzymes are green catalysts that possess a high degree of specificity. Disadvantages of them are their instability and nonreusability. ***Enzyme immobilization*** is the process of confinement of ***enzyme*** to a phase (matrix/support) different from the one for substrates and products (Datta, Christena et al. 2013) and it is a good way to overcome limitations of enzymes to some extent. Electrospun nanofibers have a great potential to support enzymes that can be adsorbed or attached to the nanofiber surface with covalent bonds. Crosslinking enzymes to electrospun nanofibers provides greater residual activity, it provides increased surface area and porosity (Kim, Grate et al. 2008). Electrospun nanofibers could increase the catalyzing ability of the immobilized enzymes.

Food packaging provides longer shelf life with safety and quality as per the international standarts (Kumar, Kumar et al. 2019). The aims of food packaging are suppression of microorganism growth, resist against oxidation, fitration of elements, preserve from environmental conditions (Topuz and Uyar 2019). Electrospun nanofibers have special benefits for food packaging applications. Electrospun nanofibers allow high active agent loading. Besides, their high surface area increases their response to its surrounding conditions with the timely release of active materials. Another important advantage of nanofibers; very small gaps between the fibers which restrain bacterial entry. Fuctional advantages of nanofibers are their high loading capasity, improved stability of sensitive bioactive molecules, and food-grade polymers usage (Tian, Deng et al. 2019). Antimicrobial electrospun nanofibers could be obtained readily by incorporation of plant extracts to the fibers (Zhang, Jin et al. 2017). Protein electrospun nanofibers could be utilized as food packaging materials for different foods and by incorporation of active components they can turn into antimicrobial, antibacterial and antifungal materials.

## CONCLUSIONS

Protein fiber formation occurs with chain entanglements and reversible functions of the proteins, the breaking and reforming of disulfide bonds. Soy and whey proteins, zein, gelatin, and casein are commonly used electrospun polymers for food applications. Protein nanofibers indicated high encapsulation efficiency and well controlled release properties. Moreover, they help to increase the catalyzing ability of the immobilized enzymes. Electrospun nanofibers are also great materials for active food packaging and preservation to prolong the shelf life of foods.

## REFERENCES

Casper, C. L., et al. (2004). "Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process." Macromolecules 37(2): 573-578.

Cho, D., et al. (2012). "Mechanical properties and biodegradability of electrospun soy protein Isolate/PVA hybrid nanofibers." Polymer degradation and stability 97(5): 747-754.
Cho, D., et al. (2010). "Electrospun hybrid soy protein/PVA fibers." Macromolecular Materials and Engineering 295(8): 763-773.
Datta, S., et al. (2013). "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials." 3 Biotech 3(1): 1-9.
Deitzel, J., et al. (2002). "Electrospinning of polymer nanofibers with specific surface chemistry." Polymer 43(3): 1025-1029.
Deng, L., et al. (2019). "Encapsulation of allopurinol by glucose cross-linked gelatin/zein nanofibers: Characterization and release behavior." Food Hydrocolloids 94: 574-584.
Dhineshbabu, N. R., et al. (2014). "Electrospun MgO/Nylon 6 hybrid nanofibers for protective clothing." Nano-Micro Letters 6(1): 46-54.
Dosunmu, O., et al. (2006). "Electrospinning of polymer nanofibres from multiple jets on a porous tubular surface." Nanotechnology 17(4): 1123.
Fang, Q., et al. (2016). "Studies on soy protein isolate/polyvinyl alcohol hybrid nanofiber membranes as multi-functional eco-friendly filtration materials." Materials Science and Engineering: B 214: 1-10.
Formo, E., et al. (2008). "Functionalization of electrospun TiO2 nanofibers with Pt nanoparticles and nanowires for catalytic applications." Nano letters 8(2): 668-672.
Huang, C.-Y., et al. (2016). "Comparison of cell behavior on pva/pva-gelatin electrospun nanofibers with random and aligned configuration." Scientific reports 6: 37960.
Ince Yardimci, A., et al. (2019). CNT incorporated polyacrilonitrile/polypyrrole nanofibers as keratinocytes scaffold. Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering, Trans Tech Publ.
Kim, J., et al. (2008). "Nanobiocatalysis and its potential applications." Trends in biotechnology 26(11): 639-646.
Kriegel, C., et al. (2008). "Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers." Critical reviews in food science and nutrition 48(8): 775-797.
Kumar, T. S. M., et al. (2019). "A comprehensive review of electrospun nanofibers: Food and packaging perspective." Composites Part B: Engineering: 107074.
Matalanis, A., et al. (2011). "Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds." Food Hydrocolloids 25(8): 1865-1880.
Prabaharan, M., et al. (2011). Electrospun nanofibrous scaffolds-current status and prospects in drug delivery. Biomedical applications of polymeric nanofibers, Springer: 241-262.
Schiffman, J. D. and C. L. Schauer (2008). "A review: electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications." Polymer reviews 48(2): 317-352.
Shabafrooz, V., et al. (2014). "Electrospun nanofibers: from filtration membranes to highly specialized tissue engineering scaffolds." Journal of nanoscience and nanotechnology 14(1): 522-534.
Shanesazzadeh, E., et al. (2018). "Production and characterization of hydrophilic and hydrophobic sunflower protein isolate nanofibers by electrospinning method." International Journal of Biological Macromolecules 119: 1-7.
Sill, T. J. and H. A. von Recum (2008). "Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering." Biomaterials 29(13): 1989-2006.
Sullivan, S. T., et al. (2014). "Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers." Food Hydrocolloids 35: 36-50.
Sundarrajan, S., et al. (2014). "Electrospun nanofibers for air filtration applications." Procedia Eng 75: 159-163.
Tian, J., et al. (2019). Electrospun nanofibers for food and food packaging technology. Electrospinning: Nanofabrication and Applications, Elsevier: 455-516.
Topuz, F. and T. Uyar (2019). "Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Electrospun Nanofibers for Food Packaging Applications." Food research international: 108927.

Torres-Giner, S. (2011). Electrospun nanofibers for food packaging applications. Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging, Elsevier: 108-125.

Vega-Lugo, A.-C. and L.-T. Lim (2009). "Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly (lactic acid) electrospun fibers." Food research international 42(8): 933-940.

Wang, S., et al. (2013). "Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (Rubus strigosus) extracts." Food research international 52(2): 467-472.

Xu, X., et al. (2012). "Preparation and properties of electrospun soy protein isolate/polyethylene oxide nanofiber membranes." ACS Applied Materials & Interfaces 4(8): 4331-4337.

Yang, D., et al. (2007). "Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs." Carbohydrate polymers 69(3): 538-543.

Zhang, Z., et al. (2017). "O-acylation of chitosan nanofibers by short-chain and long-chain fatty acids." Carbohydrate polymers 177: 203-209.

Zhong, J., et al. (2018). "Electrospinning of food-grade nanofibres from whey protein." International Journal of Biological Macromolecules 113: 764-773.

# *Cheletomimus* (*Hemicheyletia*) *bregetovae* (Volgin) (Acari: Cheyletidae) Türünün Dişi Bireylerinin Merkezi Kıllarında Görülen Sayısal Varyasyonlar

Burcu Kabasakal[1]*, Salih Doğan[2]

[1]Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye
[2]Erzincan Binali Yıldırım, Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: burcukabasakal7@gmail.com

## Özet
Keyletid akarlar (Acari: Cheyletidae) dünya çapında bir yayılıma sahiptir. Bu akarların çoğu; bitkiler üzerinde, toprak ve bitki döküntüsünde predatör olarak yaşarken, bazıları böcekler, kuşlar ve memelilerde parazit olarak yaşamaktadır. *Cheletomimus* Oudemans bu familyanın en dikkat çekici cinslerinden biridir. Bu cinsin *Cheletomimus, Hemicheyletia* Volgin ve *Philippicheyla* Corpuz-Raros olmak üzere üç alt cinsi bulunmaktadır. Bu çalışmada, daha önce ülkemizden kaydı verilen *Cheletomimus* (*Hemicheyletia*) *bregetovae* (Volgin) türünün dişi bireyler üzerinden tanımı gözden geçirilerek, propodozomal ve histerozomal plakları üzerindeki merkezi kıl sayılarının farklılıkları ortaya konulmuştur. Merkezi kıllar propodozomal plakta normal olarak üç veya dört çift iken, incelenen bazı bireylerde genel durumun dışında sağ ve solda 2-3, 2-4, 3-2, 2-2, 3-4 şeklinde yerleşim göstermektedir. Histerozomal plakta ise normal olarak merkezi kıllar bir veya iki çift iken, bazı örneklerde bu kıllar sağlı sollu 2-1 şeklinde yerleşim göstermektedir. Merkezi kıl sayılarındaki bu değişkenlik durumu literatüre dayalı olarak gözden geçirilmiştir. İncelenen örneklerin çoğunda merkezi kıl sayılarının varyasyon göstermesi, türün tanımının gözden geçirilmesini gerekli kılmıştır. Ayrıca, türe ait varyasyon olgusu ilk defa bu çalışmada ayrıntılı olarak ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Avcı akar, Asimetri, *Cheletomimus*, Varyasyon, Türkiye.

## Numerical variations in the median setae of the female individuals of *Cheletomimus* (*Hemicheyletia*) *bregetovae* (Volgin) (Acari: Cheyletidae)

## Abstract
Cheyletid mites (Acari: Cheyletidae) have a worldwide distribution. While most of these mites live as predator on plants, soil and litter, some live as parasites in insects, birds and mammals. *Cheletomimus* Qudemans is one of the most remarkable species of the family. This genus has three subgenus *Cheletomimus*, *Hemicheyletia* Volgin, *Philippicheyla* Corpuz-Raros. In this study, *Cheletomimus (Hemicheyletia) bregetovae* (Volgin) recorded previously from Turkey was re-described based on the female specimens, and variations in the number of median setae on its propodosomal and hysterosomal shields were presented. While the median setae are normally three or four pairs in the propodosomal shield, in some examined specimens, except the general position, they are located in the form of 2-3, 2-4, 3-2, 2-2, 3-4 on the right-left side. Whereas the median setae on the hysterosomal shield are normally one or two pairs, in some specimens they are located in 2-1 on right-left side. These variations in the number of median setae were reviewed based on the literature. Displaying variations in the median setae in most of the examined specimens made necessary re-description of the species. In addition, the phenomenon of variation in the species was firstly introduced in detail in this study.

**Key-words:** Predator mite, Asymmetry, *Cheletomimus*, Variation, Turkey

## GİRİŞ
Keyletid akarlar (Acari: Cheyletidae) dünya çapında bir yayılışa sahiptir. Bu akarların çoğu bitkiler üzerinde, toprak ve bitki döküntüsünde predatör olarak serbest yaşarken, bazıları böcekler, kuşlar ve memelilerde parazit olarak yaşamaktadır (Bochkov ve Fain, 2001; Akpınar ve ark., 2017). Bu familya dünyada 77 cins ve 500'e yakın tür ile temsil edilmektedir (Doğan ve ark., 2011, 2019; Bochkov and Abramov, 2016; Ardeshir, 2017; Salarzehi ve ark., 2018, 2019). Ülkemizden ise bu grubun 23 türü bilinmektedir. (Özkan ve ark., 1988; Emre ve ark., 2011; Dik, 2012; Akpınar ve ark., 2017; Miman ve Dik, 2017; Dik ve Uslu, 2018; Doğan ve ark., 2019a,b).

*Cheletomimus* (*Hemicheyletia*) *bregetovae* ilk olarak Volgin (1969) tarafından Bulgaristan, Ukrayna ve Ermenistan'dan verilmiştir. Daha sonra Hawaii Takımadaları, Kırım, Filipinler ve Rusya'dan bildirilmiştir. Bu türün, ülkemizden ilk defa Koç ve Ayyıldız (1996) tarafından kaydı verilmiştir. Çalışmanın amacı ülkemizde bilinen *Cheletomimus (H.) bregetovae* Volgin (1969) türünün dişi bireyleri arasındaki merkezi kıl sayılarındaki varyasyonların gösterilerek, farklılıklarının ortaya konulmasıdır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Akar örneklerinin toplanması, ayıklanması, preparasyonu ve saklanmasında daha önce Doğan ve ark. (2019a, b) ve Walter ve Krantz (2009) tarafından belirtilen yöntemler izlendi. Akarların genel görünüşü ve ayırt edici karakterlerine ait çizimleri ve fotoğraflama işlemleri, faz-kontrast donanımlı LEICA DM 4000B model ışık mikroskobu kullanılarak yapıldı. Vücut büyüklüğü ve çeşitli vücut yapılarının ölçümleri ise LAS V 3.8 programı yardımıyla µm cinsinden alındı. Çalışmada Kethley (1990) ve Grandjean (1944) tarafından önerilen terminoloji kullanıldı.

## BULGULAR

### *Cheletomimus* (*Hemicheyletia*) *bregetovae* (Volgin, 1969)

**Dişi** (Şekil 1-5)

Vücut gnatozoma dâhil 337 (319-367) µm uzunluğunda, 195 (176-225) µm genişliğindedir. Gnatozoma 113 (101-120) µm uzunluğunda ve 124 (115-130) µm genişliğindedir.
Dorsal kısım iki büyük plak ile kaplıdır ve üzeri tegmen ile aynı desene sahiptir. Gözler mevcuttur ve propodozomal plağın yan kenarlarına karşılıklı olarak yerleşmiştir. Propodozomal plağın uzunluğu 106 (102-115) µm, genişliği 160 (150-180) µm'dir. Propodozomal plağın yanal kılları geniş ve yelpaze şeklinde ve dört çifttir. Bu kılların uzunlukları 28 (26-30) µm arasında değişmektedir. Merkezi kıllar ise geyik boynuzu şeklinde olup genel olarak üç çifttir. Bu kıllar, incelenen bazı bireylerde genel durumun dışında sağ ve solda 2-3, 2-4, 3-2, 2-2, 4-4 şeklinde yerleşim göstermektedir (Şekil 5, Tablo 1). Humeral kıllar propodozamal plağın arka yan kısımlarında, çizgili integüment üzerinde bulunur. Histerozomal plak arka kısma doğru daralmış şekildedir. Bu plağın uzunluğu 86 (82-99) µm, genişliği 116 (105-124) µm'dir. Plak üzerinde uzunlukları 23 (20-25) µm arasında değişen dört çift yanal kıl bulunmaktadır. Merkezi kıllar ise propodozomal plakta bulunan kıllar gibi geyik boynuzu şeklindedir. Plak üzerinde genellikle bir çift merkezi kıl bulunurken incelenen birkaç örnekte bu kıllar iki çift veya sağlı sollu 2-1 şeklinde yerleşim göstermektedir (Şekil 6, Tablo 1). Bir çift kıl ise histerozomal plağın arka tarafında, integüment üzerine yerleşmiştir (Şekil 1).

Karın çizgilidir ve 1*a*, 3*a*, 4*a* kıllarını taşır. I.-II. ve III.-IV. koksalar birbirlerine kaynaşmış bir şekilde yerleşmiştir. Anogenital bölgede sekiz çift kıl mevcuttur. Bu kıllardan üç çifti aggenital ($ag_{1-3}$), iki çifti genital ($g_{1,2}$) ve üç çifti ise pseudanal kıl ($ps_{1-3}$) şeklindedir (Şekil 2).

Rostrum kısa ve konik olup bir yanal ve bir de orta kısımda kıl bulundurur. Tegmen ve protegmen granüllü bir şekildedir. Peritrem her iki tarafta altı parçalı bir şekilde yerleşmiştir. Palp geniştir. Palp tırnakları 6-8 dişlidir ve dişler oldukça küçüktür. Palp femuru üç kıl taşır. Palp genusunda dorsal ve vental kısmında aynı şekle sahip birer kıl mevcuttur. Palp tibiyasında üç kıl bulunur ve bu kıllar dorsal ve ventral kısımda kalınlaşmış ve tüysü yapıdadır. Palp tarsusunda ikisi tarak ve ikisi de orak şeklinde olmak üzere dört kıl mevcuttur. Apodem, subkapitulumun orta hattı üzerinde uzamış ve subkapitulum kılları arasında az çatallı bir yapıya sahiptir. Subkapitulum kılı düz ve basit yapıdadır (Şekil 3).

Bacaklar birbirine yakın uzunluktadır ve idiozomadan kısadır. Bacakların uzunlukları: I. bacak 201 (195-214), II. bacak 158 (151-169), III. bacak 167 (166-168), IV. bacak 180 (172-192) µm'dir. Kılların bacak parçalarına dağılımı şu şekildedir: koksa 2–1–2–2, trokanter 1–1–2–1, femur 2–2–2–1, genu 2(+1κ)–2–2–2, tibiya 5(+1φ)–4–4–4, tarsus 9(+1ω)–7(+1ω)–7–7 (Şekil 4).

**İncelenen Örnekler ve Yaşama Alanları:** 2 ♀♀, ağaç altından yosun ve döküntü, 40º24'61K 37º13'31D, 514 m, Reşadiye, 17.05.2009; 3 ♀♀, meşe (*Quercus* sp.) altından döküntü ve toprak, 40º20'02K 38º43'48D, 1575 m, Alucra, 27.07.2007; 4 ♀♀, dut (*Morus* sp.) kovuğu, 40º36'56K 36º47'19D, 350 m, Günlüce, Niksar, 23.09.2007; 3 ♀♀, meşe, alıç (*Crataegus* sp.) ve kızılcık (*Cornus* sp.) altından karışık döküntü ve meşe

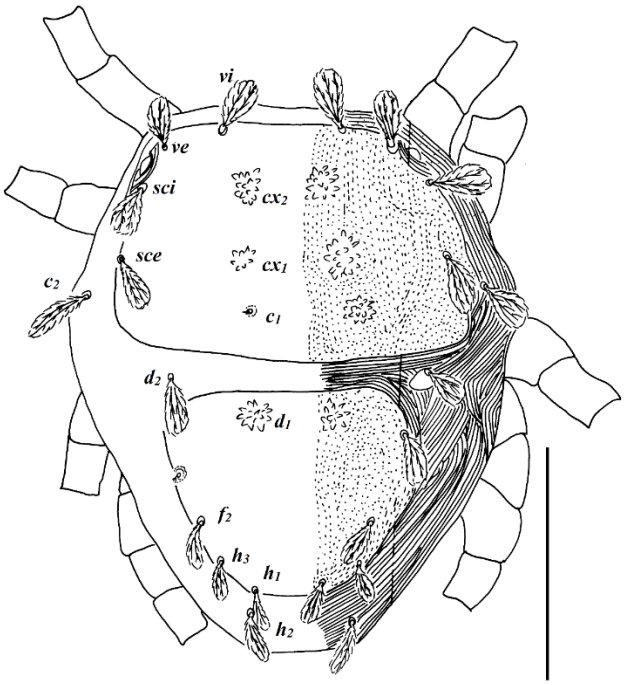
kovuğu, 40°36'56K 36°47'19D, 350 m, Günlüce, Niksar, 23.09.2007; 1 ♀, söğüt (*Salix* sp.) kovuğu, 40°07'38K 38°13'39D, 862 m Esenkaya, Suşehri, 23.09.2007; 1 ♀, sakızlak (*Pistacia* sp.) altından döküntü, 40°38'37K 36°37'38D, 305 m, Erbaa, 15.03.2008; 1 ♀, çürümüş ceviz ağacı (*Juglans* sp.) kütüğü, 40°17'46K 37°43'04D, 630 m, Ortaseki köyü, Koyulhisar, 29.08.2008; 2 ♀♀, karınca yuvası, Köse Dağı, 40°16'31K 39°37'20D, 1880 m, 16.11.2008; 5 ♀♀, su kenarı fındık (*Corylus* sp.) yaprağı, 40º04'76K 39º02'65D, 1329 m, Tomara Şelalesi, Şiran, 10.05.2012; KELKİT VADİSİ, TÜRKİYE.

**Yayılışı:** Bulgaristan, Ermenistan, Filipinler, Hawaii Takımadaları, Kırım, Rusya ve Türkiye (Volgin, 1969; Corpuz-Raros, 1972, 2000; Patxot ve Goff, 1985; Koç ve Ayyıldız, 1996; Fain ve ark., 2002; Ayyıldız ve ark., 2010).

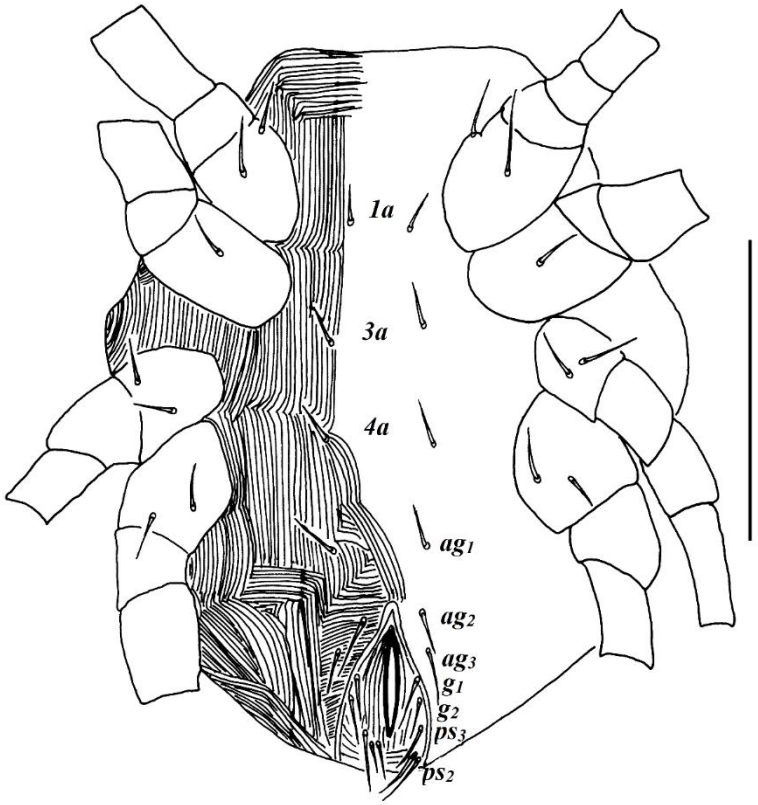
**Tartışma:** *Cheletomimus* cinsinin *Cheletomimus* Oudemans, *Hemicheyletia* Volgin ve *Philippicheyla* Corpuz-Raros olmak üzere üç alt cinsi bulunmaktadır. Cinsin ülkemizde *Cheletomimus* (*C.*) *berlesei* (Oudemans), *Cheletomimus* (*H.*) *bakeri* (Ehara), *Cheletomimus* (*H.*) *bregetovae* (Volgin) ve *Cheletomimus* (*H.*) *wellsi* (Baker) olmak üzere dört türü bilinmektedir (Koç ve Ayyıldız, 1996; Doğan ve Ayyıldız, 2004; Çakmak ve Çobanoğlu, 2012 , Yeşilayer ve Çobanoğlu, 2012).

*Cheletomimus bregetovae*, I. bacak tibiyasının 5 kıla sahip olması, gözlerin varlığı ve vücudun dorsal kısmının iki plakla örtülü olmasıyla cinsin diğer türleri ile benzerlik gösterirken, farklılaşmış kıl yapısı türün belirgin özelliği olarak görülmektedir. Propodozomal ve histerozomal plak üzerinde bulunan yanal ve merkezi kıllar, yapıları bakımından farklılaşmıştır. İncelenen örneklerin vücut büyüklüğü ile kıl yapıları, türün daha önce verilen örneklerine benzerlik göstermekle birlikte incelenen bazı bireylerde plaklar üzerindeki merkezi kılların sayılarında varyasyonlar mevcuttur (Şekil 5-6, Tablo 1)Bununla birlikte, Koç ve Ayyıldız (1996) tarafından verilen şekilde propodozomal plaktaki merkezi kılların tek taraflı ve dört adet olduğu görülmektedir. Bu karakterlerin değişken olduğu ayrıca Fain ve ark. (2002) tarafından da belirtilmiş olmakla birlikte türe ait bu olgu ilk defa bu çalışmada ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

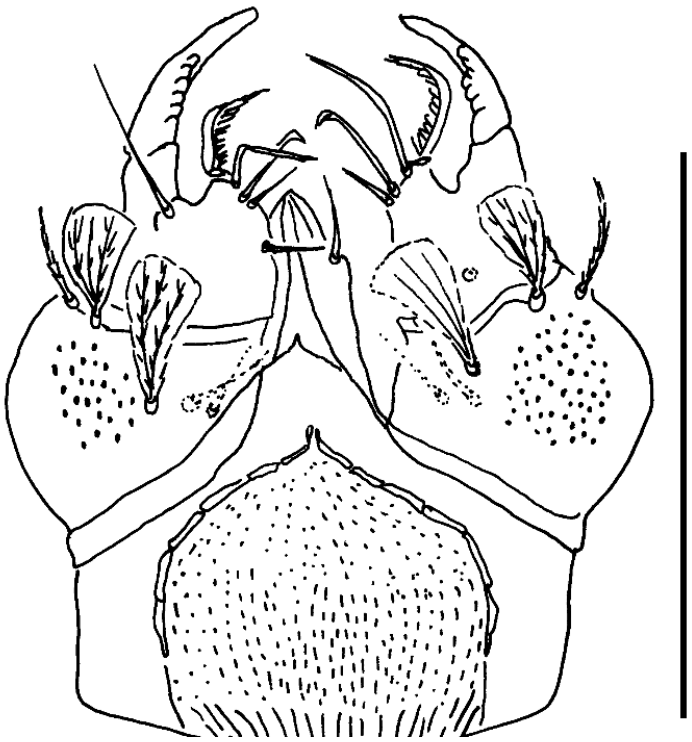
*Cheletomimus* (*Hemicheyletia*) *bregetovae* ilk olarak Volgin (1969) tarafından Bulgaristan, Ukrayna ve Ermenistan'dan verilmiştir. Daha sonra Hawaii Takımadaları, Kırım, Filipinler ve Rusya'dan bildirilmiştir. Bu türün, ülkemizden ilk defa Koç ve Ayyıldız (1996) tarafından kaydı verilmiştir.




**Şekil 1.** *Cheletomimus* (*H.*) *bregetovae* (Dişi) Vücudun üstten görünümü (Ölçek: 100 µm).



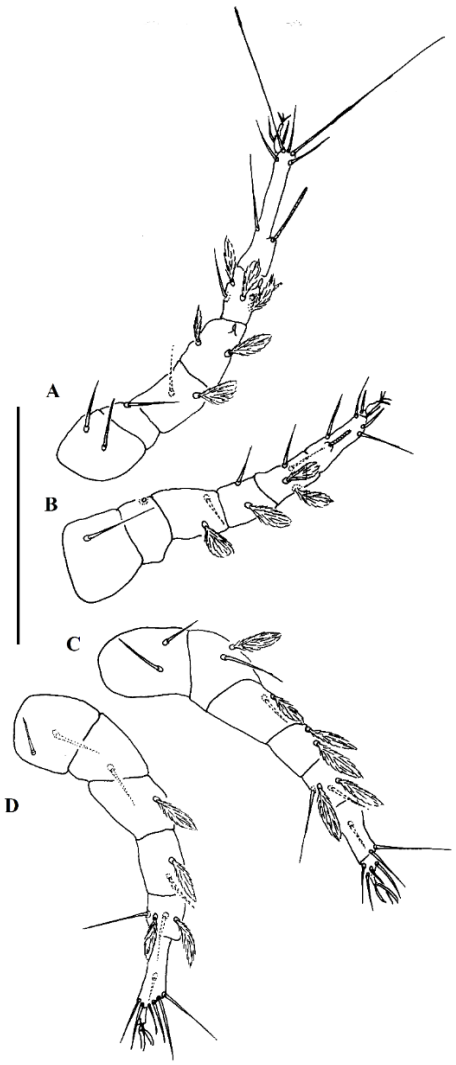

**Şekil 2.** *Cheletomimus* (*H.*) *bregetovae* (Dişi) Vücudun alttan görünümü (Ölçek: 100 µm).



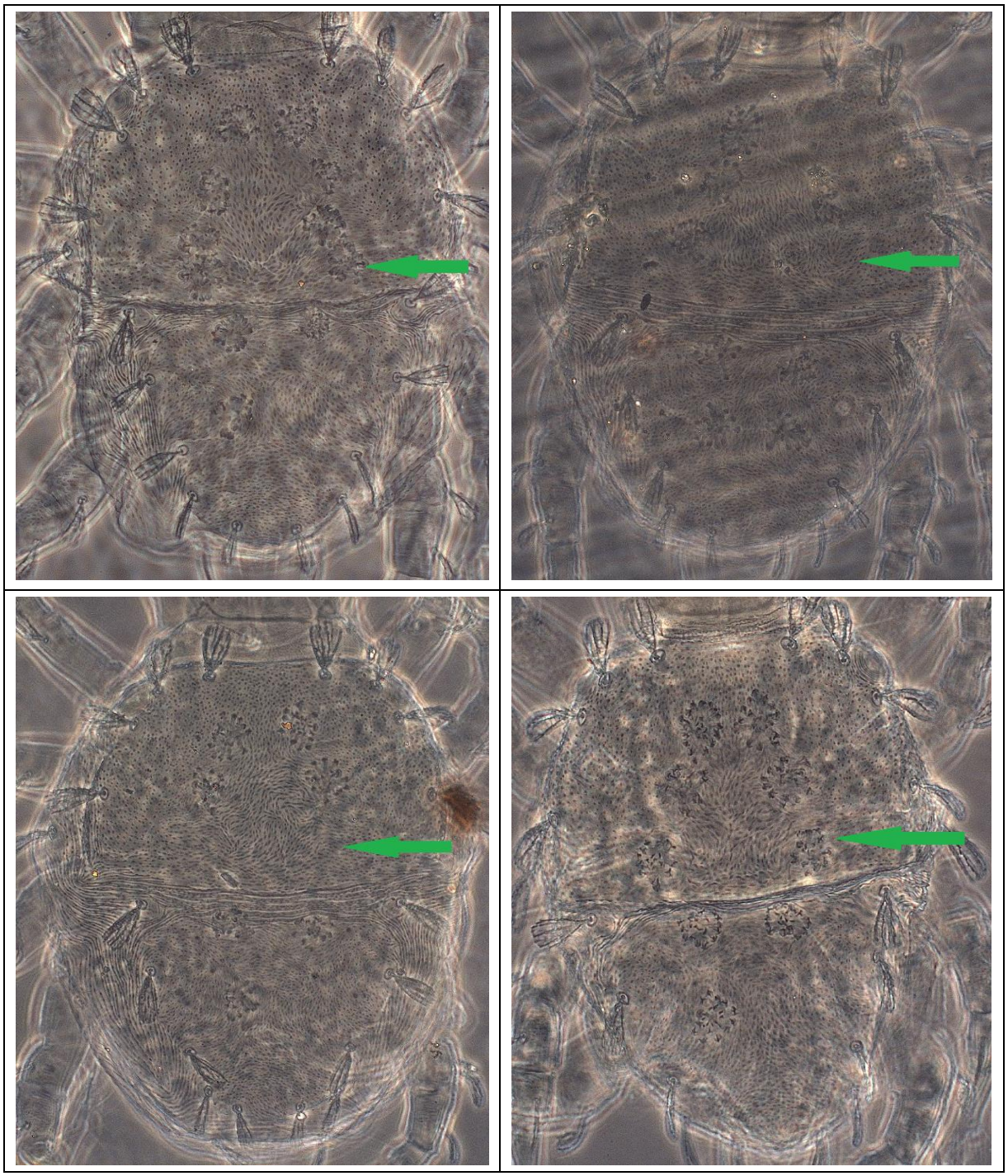
**Şekil 3**. *Cheletomimus* (*H.*) *bregetovae* (Dişi) Gnatozoma (Ölçek: 100 µm).

**Tablo 1.** *Cheletomimus* (*Hemicheyletia*) *bregetovae* türünün merkezi kıl sayılarında görülen varyasyonlar.

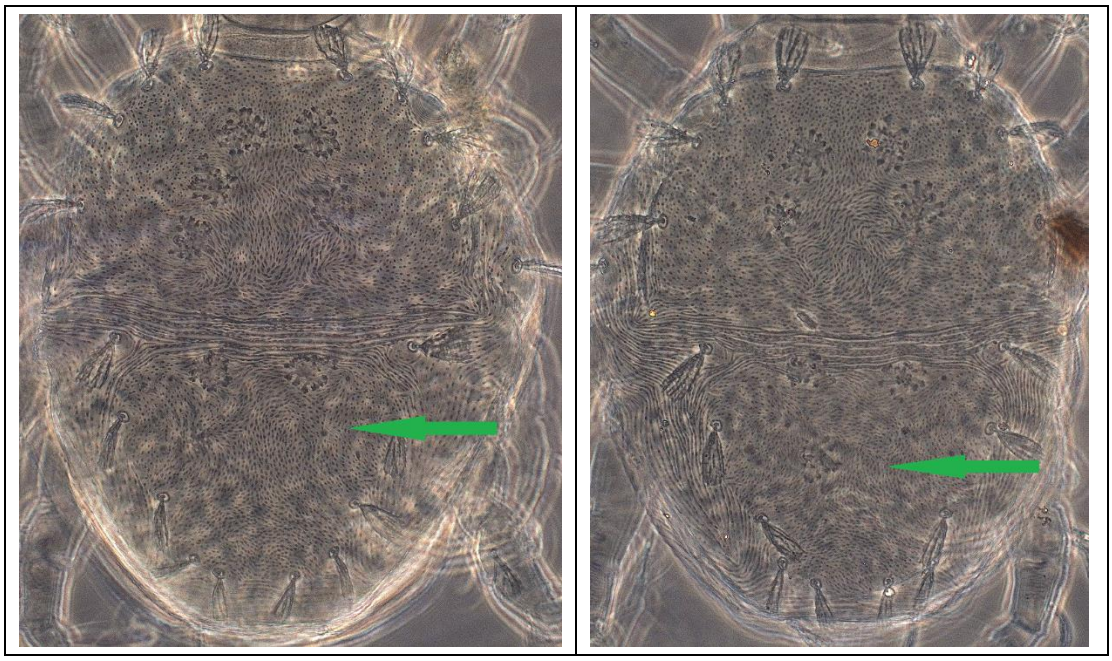
| Bireyler | Propodozomal plak sol – sağ | Histerozomal plak sol – sağ |
|---|---|---|
| 7 ♀♀ | 3-3 | 1-1 |
| 1 ♀ | 3-3 | 2-2 |
| 1 ♀ | 3-3 | 2-1 |
| 1 ♀ | 3-2 | 2-2 |
| 3 ♀♀ | 3-2 | 1-1 |
| 1 ♀ | 2-2 | 2-1 |
| 4 ♀♀ | 2-3 | 1-1 |
| 1 ♀ | 2-3 | 2-2 |
| 1 ♀ | 2-4 | 1-1 |
| 1 ♀ | 4-4 | 2-1 |
| 1 ♀ | 3-4 | 2-2 |




**Şekil 4.** *Cheletomimus* (*H.*) *bregetovae* (Dişi) **A)** I. Bacak, **B)** II. Bacak, **C)** III. Bacak, **D)** IV. Bacak (Ölçek: 100 µm).



**Şekil 5.** *Cheletomimus* (*H.*) *bregetovae* (Dişi). Propodozomal plak üzerindeki merkezi kıl sayılarında görülen varyasyonlar.



**Şekil 6.** *Cheletomimus* (*H.*) *bregetovae* (Dişi). Histerozomal plak üzerindeki merkezi kıl sayılarında görülen varyasyonlar.

**TEŞEKKÜR**

Çalışmanın materyalini, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen 107T183 numaralı proje ile Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 11BAP18 numaralı projeden edilen örnekler oluşturmaktadır. Bu çalışma, ilk yazarın devam eden doktora tezinden veriler içermektedir.

**KAYNAKLAR**

Akpınar D, Çobanoğlu S, Öğreten A, 2017. Cheyletidae familyasının özellikleri ve biyolojik mücadelede kullanım olanakları. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 4(1): 9-13.

Ardeshir F, 2017. Cheyletid mites (Acari: Trombidiformes) in stored grain in Iran. Persian Journal of Acarology, 6(1): 11-24.

Ayyıldız N, Per S, Taşdemir A, Urhan R, Baran Ş, Toluk, A, Koç K, 2010. Yusufeli (Artvin)'den kaydedilmiş toprak akarları. Geçmişten Geleceğe Yusufeli Sempozyumu, 9-11 Haziran, 2010, Yusufeli, Artvin, Türkiye, Yusufeli Belediyesi Yayını, İstanbul, Türkiye, 279-293.

Corpuz-Raros L, 1972. Systematic studies of Philippine cheyletid mites. I. Preliminary report of species mainliy from Laguna. The Philippine Entomologist, 72: 247-271.

Corpuz-Raros L, 2000. Guide to Philippine predatory mites: Family Cheyletidae Leach. University of the Philippines Los Baños College, The Museum of Natural History, 48.

Çakmak İ, Çobanoğlu S, 2012. *Cheletomimus bakeri* (Ehara, 1962) (Acari: Cheyletidae) A new record for the Turkish fauna. Türkiye Entomoloji Bülteni, 2(1): 49-52.

Dik B, 2012. Türkiye'de ilk *Ornithocheyletia hallae* Smiley, 1970 (Acariformes: Actinedida: Cheyletidae) olgusu ve *Pseudolynchia canariensis* (Mcquart, 1840) (Diptera: Pupipara: Hippoboscidae)'lerdeki yaygınlığı. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 36: 169-173.

Dik B, Uslu U, 2018. Ectoparasites of hares (*Lepus europaeus* Pallas) in Konya Province, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 42: 65-72.

Doğan S, Ayyıldız N, 2004. The first records of two cheyletid mites from Turkey: *Chelotomimus* (*Hemiceyletia*) *wellsi* (Baker, 1949) and *Hypopicheyla elongata* Volgin, 1969 (Acari: Cheyletidae). Zootaxa, 583: 1-4.

Doğan S, Jalaeian M, Kamali H, 2011. New records of two cheyletid mites (Acari:Cheyletidae) from Iran. Turkish Journal of Zoology, 35(5): 781-782.

Doğan S, Doğan S, Erman O, 2019a. *Eutogenes frater* Volgin (Acari, Cheyletidae): A new member of the acarofauna in Turkey. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 6(4): 685-695

Doğan S, Doğan S, Kabasakal B, 2019b. New occurrence of the mite genus *Columbicheyla* Thewke and Enns (Acari, Cheyletidae) in Turkey. Acarological Studies, 1(1): 48-50.

Doğan S, Kabasakal B, Doğan S, 2019c. A long-legged mite species from Turkey: *Cheletomorpha lepidopterorum* (Shaw) (Acari: Cheyletidae). Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 136-147.

Emre S, Yağlı S, Metin A, Kılıçarslan A, Demir Pektaş S, 2011. Şeyletiella dermatiti. Türkderm, 45: 213-215.

Fain A, Bochkov AV, Corpuz-Raros LA. 2002. A revision of *Hemicheyletia* generic group (Acari: Cheyletidae). Entomologie, 72: 27-66.

Gerson U, Fain A, Smiley RL, 1999. Further observations on the Cheyletidae (Acari) with a key to the genera of the Cheyletidae and a list of all known species in the family. Bulletin de L'institut Royal des Sciences Naturelles de Belgiaue, Entomologie, 69: 35-86.

Grandjean F, 1944. Observations Sur les Acariens de la Famille des Stigmaeidae. Archives des Sciences Physiques et Naturelles, 26: 103-131.

Kethley J, 1990. Acariformes, Prostigmata. In: Soil biology guide, Dindal, D.L. (Ed.), Wiley, New York, 667-756.

Koç K, Ayyıldız N, 1996. Türkiye faunası için iki yeni keyletid (Acari, Prostigmata, Cheyletidae) türü. Turkish Journal of Zoology, 20: 215-221.

Miman Ö, Dik B, 2017. First report of cheyletiellosis due to the skin mite *Cheyletiella parasitivorax* Megnin, 1878 in a human in Turkey. Elyns Journal of Microbes, 2(1): 1-3.

Özkan M, Ayyıldız N, Soysal Z, 1988. Türkiye akar faunası. DOĞA TU Zooloji Dergisi, 12: 75-85.

Patxot DJ, Goff ML, 1985. Two new species and new records of Cheyletidae (Acari) in Hawaii and key to the species. International Journal of Acarology, 11: 157-162.

Salarzehi S, Hajizadeh J, Hakimitabar M, Ueckermann EA, 2018. A contribution to the knowledge of cheyletid mites of Iran with redescription of *Eucheyletia flabellifera* (Michael, 1878) (Prostigmata: Cheyletidae). Acarologia, 58(2): 457-470.

Salarzehi S, Hajizadeh J, Ueckermann EA 2019. A new species of *Cheletonella* Womersley (Prostigmata: Cheyletidae) from Iran and a key to the species. Acarologia, 59(2): 188-

Volgin VI, 1969. Acarina of the family Cheyletidae of the World. Akademia Nauk, Leningrad, USSR, 432 [In Russian]. Translated by Rao, P.M. (1987). Amerind Publishing Company, New Delhi, 532 [In English].

Walter DE, Krantz G, 2009. Collecting, rearing, and preparing specimens. In: A manual of Acarology, 3rd ed., Krantz GW, Walter DE (Eds), Texas Tech University Press, Lubbock, 83-96.

Yeşilayer A, Çobanoğlu S, 2012. Türkiye akar faunası için yeni bir kayıt: *Cheletomimus berlesei* (Oudemans) (Acari: Cheyletidae). Türkiye Entomoloji Bülteni, 2(3): 183-188.

# Investigation of changes in growth and amount of water soluble vitamins in *Citrobacter freundii* under cadmium stress

Muhammad Salihu Ibrahim [1, 2*], Meltem Çakmak[3], DursunÖzer[3], Fikret Karatas[1]

[1]Fırat University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Elazig, Turkey
[2]Kano State Polytechnic, School of Technology, Department of Science Laboratory Technology, Kano, Nigeria
[3]Firat University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering Elazig Turkey
*Corresponding Author e-mail: muhammadibrahim1247@gmail.com

## Abstract

In this study, *Citrobacter freundii* (*C.freundii*) was incubated (LB medium) in varying concentration of cadmium and its concentration was examined by UV-VIS spectrophotometer. The amount of water soluble vitamins in the bacteria was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The bacteria were incubated at 0, 40, 60, 75, 100, 125, 150 and 200µg/mL cadmium with the 0 µg/mL group serving as control. The bacteria were able to grow at concentration up to 150µg/mL cadmium. However, no growth was observed at 200µg/mL cadmium. No significant difference in the bacterial concentration was observed when 40µg/mL group was compared with control group. A significant decrease in the bacterial concentration was seen when 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control group ($p<0.05$). There was a 44.8% and 47.7% decrease in the bacterial concentration at 100 and 125µg/mL respectively.A significant decrease in the amount of vitamin C, B1, B2, B3, B5, B6, B9 and B12 was seen when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control ($p<0.05$). Having the ability to grow under cadmium stress, *C.freundii* might be useful for cadmium remediation in contaminated environment.

**Keywords**: *Citrobacter freundii*, cadmium, vitamins, stress

## INTRODUCTION

Heavy metals are classified as metallic elements with a relatively high density compared to water (Duffus 2002). Many environmental and global public health issues have recently been related to environmental contamination by these metals. Human use has also increased dramatically as a result of an exponential increase in its use in several manufacturing, agricultural, domestic and technical applications (Bradl2002). Environmental sources of heavy metals include geogenic, mining, agricultural, medicinal, domestic and atmospheric effluents. Environmental pollution is significant in areas such as mining, smelters and foundries and other metal-based manufacturing sites (He et al 2005).Though heavy metals are naturally occurring elements found throughout the earth's crust, most environmental contamination and human exposure are the result of anthropogenic activities such as mining and smelting operations, industrial products, domestic use and metal-containing agricultural use. Several researches has shown that the production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress are key factors in the toxicity and carcinogenicity of metals such as arsenic (Yedjou&Tchounwou 2006), cadmium (Mehrdadet al 2017), chromium (Patlollaet al 2009), lead (Yedjou&Tchounwou 2008), and mercury (Sutton &Tchounwou 2007). Because of their high degree of toxicity, these five elements have been listed as priority metals of great importance to public health. Cadmium is a heavy metal of considerable concern for the environment and function. It is widely distributed at an average concentration of approximately 0.1 mg / kg in the earth's crust.

*Citrobacter freundii* (*C.freundii*) is a member of the Enterobacteriaceae family which is anaerobic gram-negative bacteria(Qing & Ping 2016).Environmental pollution by heavy metals has become widespread, and bacteria are now been studied for its ability to bioremediate and bioaccumulate some of these toxic metals. *C.freundii* was reported to have the potential of copper bioaccumulation (Sharma &Fulekar 2009). In this study, cadmium was used to induce stress in *C.freundii.* It was incubated in a liquid medium at varying concentration of the heavy metal (cadmium) and changes in growth and water soluble vitamins level were analyzed. The bacterial concentration was examined by UV-VIS spectrophotometer. The amount of water soluble vitamins in the bacteria was determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

## MATERIALS AND METHODS

In this study, *C.freundii* was obtained and cultured in department of chemical engineering, faculty of engineering Firat University Elazig Turkey.

### Equipments and Chemicals

HPLC was performed with the SHIMADZU Prominence-İ LC- 2030C 3D Model and PDA detector and Spectrophotometry was performed with CHEMBIOS s.r.l. OPTIMUM-ONE UV-VIS Spectrophotometer. All the chemical reagents used in the analysis were analytical grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Double distilled water was used throughout the work.

### Statistical analysis

All measurements were carried out in triplicates. Mean standard deviation was determined and the results were subjected to Analysis of Variance. The SPSS 10.0 for Windows was used for variance analysis and LSD multiple comparison test was performed at $p<0.05$.

### Bacteria processing

We prepared 250mL LB of 6 groups. Each group is divided into 5 conical flasks containing 50mL each. For the 250mL LB preparation, we used 1.25g of Yeast bacto, 2.5g of Peptone and 2.5g of NaCl (sodium chloride).

### Cadmium preparation

In this study, we used cadmium chloride ($CdCl_2$) and prepare 500ppm in 250mL

$(500mgCd/L) \times (1L/1000mL) \times (183.31gCdCl_2/112.4gCd) \times (250mL \times 1.0g/1000mg) = 0.21g$

0.21g of $CdCl_2$ was then dissolved in 250mL of pure distilled water.

### LB (liquid broth) preparation procedure with cadmium

For each group, 250mL of LB was prepared with cadmium in each group with the exception of control group. The bacteria were incubated at 0, 40, 60, 75, 100, 125, 150 and 200µg/mL cadmium with the 0 µg/mL group serving as control.

### Sterilization, Inoculation and Incubation

For the sterilization process, we firstly covered each conical flask with a cotton wool or bandage then we covered the top with aluminum foil. Then we placed it in an autoclave. We set it to reach a pressure of 1.2 bars and a temperature of 121˚C. Then we took it out and placed it in a laminar flow carbine and let it stayed for 30minute under UV light. After cooling down in the laminar flow carbine, the next step is inoculation. We light up the Bunsen burner in the carbine and we used a micropipette. We put 0.5µL of *C.freundi* in each conical flask. For the incubation process, we used a shaking incubator with a temperature of 37˚C and 150 rpm. After inoculation, all the conical flasks were placed in the incubator and we incubate for 16-18 hours.

### Spectrophotometer Reading

In order to take the spectrophotometer readings, we adjust the wave length to 600nm. We then used plastic tubes to collect the LB and we put 0.4mL in a plastic curvet. Then we centrifuged the remaining LB in the tube for 6.0 minute at 6000rpm. Then 1.6mL of the centrifuged LB was taken and used to dilute the 0.4mL making a total of 2.0 mL. Each group was made like this and we took a portion of the centrifuged LB of each group to make a blank for that group. Figure 1 shows the calibration curve for *C.freundii* which is used for the bacterial calculations.

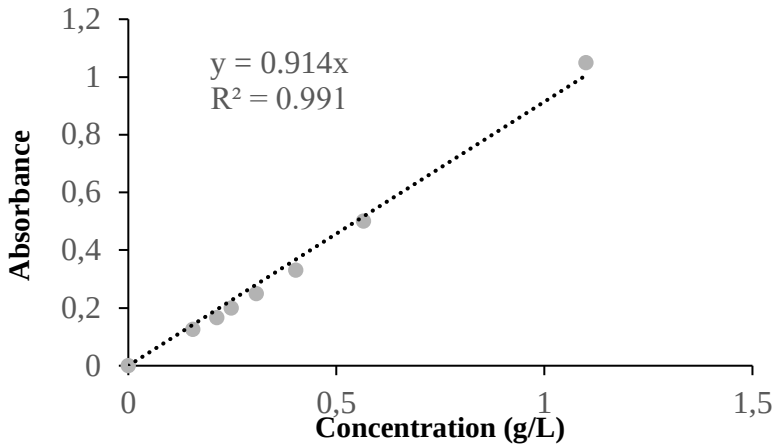



**Figure 1** *C.freundii* calibration curve

**Making samples ready for Vitamins analysis**

After centrifugation, each group is collected in one tube to have the concentrated bacteria. The liquid portion was then removed, and then we washed with distilled water 2 times, then vortexed.

**Determination of Vitamins**

3ml of distilled water was added to each tube and vortexed, then ultrasonic break by using ultrasonicator. Each tube with the bacteria was mixed with the ultrasonicator for 7.5minuteat every 1.5 minute each tube is shaken again by using the vortex. After ultrasonic break, 1.0mL of 0.5M perchloric acid was added to each tube and then vortexed. The tubes were placed in a sonicator for 5.0 minute and then centrifuged for 10minute at 6000rpm. The clear portion was then taken into HPLC vials for HPLC analysis. Column Exsil 100-5 ODS flow rate of 1.0 mL/min (25 cm, 4.6 mm ID, 5 µm) was used. HPLC peaks for vitamin B1 was measured at 247nm, B2 at 269nm, B3 at 262nm, B5 at 212nm, B6 at 291nm, B9 at 273nm, B12 at 361nm and vitamin C at 244nm (Ivanovic 1999 and Amidzic2005). For vitamin C mobile phase, we use 0.5 g of potassium dihydrogen phosphate and mixed in 1 liter of distilled water, then adjusted to PH of 3.4 by using ortho-phosphoric acid (Tavazzi1992). For vitamin B complex mobile phase, we prepared 1 liter by using 250mL methanol, 750mL distilled water, 0.75g heptanes-1-sulfonic acid sodium salt and 0.75mLtriethylamine (TEA). The mixture was adjusted to PH of 2.8 by using ortho-phosphoric acid.

**RESULTS and DISCUSSION**

**Optimum growth conditions**

The most suitable temperature for *C.freundii* was found to be 37°C and it revealed maximum growth at pH 8. The effect of $Cd^{2+}$ on the growth of *C.freundii* was monitored by growing it in the presence of 40, 60, 75, 100, 125, 150 and 200µg/mL$Cd^{2+}$ and absence of $Cd^{2+}$. The presence of $Cd^{2+}$ significantly decreased the growth of the bacterium (Figure 2).

**Changes in *C.freundii* Concentration under Cadmium Stress**

The bacteria were incubated at 0, 40, 60, 75, 100, 125, 150 and 200µg/mL cadmium with the 0 µg/mL group serving as control. The bacteria were able to grow at concentration up to 150µg/mL cadmium. However, no growth was observed at 200µg/mL cadmium. No significant difference in the bacterial concentration was observed when 40µg/mL group was compared with control group. A significant decrease in the bacterial concentration was seen when 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control group ($p<0.05$). There was a 44.8% and 47.7% decrease in the bacterial concentration at 100 and 125µg/mL respectively (figure 2 and table 1).

**Table 1** *C.freundii* concentration and water soluble vitamin levels at different Cadmium concentration

| **Cadmium (µg/mL)** | 0 | 40 | 60 | 75 | 100 | 125 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *C.freundii*(µg/mL) | 4.71±0.02 | 4.48±0.10 | 4.26±0.04 | 4.05±0.01 | 2.60±0.11 | 2.47±0.26 |
| Vitamin B1 (µg/mL) | 26.00±0.57 | 8.85±1.12 | 5.36±0.24 | 3.12±0.17 | 2.726±0.17 | 2.57±0.15 |
| Vitamin B2 (µg/mL) | 1.20±0.14 | 0.83±0.03 | 0.54±0.02 | 0.24±0.02 | 0.03±0.00 | - |
| Vitamin B3 (µg/mL) | 362.10±10.08 | 59.78±0.57 | 56.16±0.75 | 51.27±0.70 | 51.23±0.77 | 13.37±0.57 |
| Vitamin B5 (µg/mL) | 3324±101.10 | 1114±11.04 | 501.0±0.34 | 376.6±6.21 | 56.28±6.11 | 17.08±0.32 |
| Vitamin B6 (µg/mL) | 2.399±0.40 | 0.629±0.05 | 0.20±0.05 | 0.16±0.02 | - | - |
| Vitamin B9 (µg/mL) | 20.53±0.10 | 14.59±0.65 | 13.41±1.78 | 2.90±0.90 | 1.67±0.27 | 1.23±0.52 |
| Vitamin B12 (µg/mL) | 1.72±0.02 | 0.57±0.02 | 0.44±0.03 | 0.41±0.02 | 0.36±0.01 | 0.24±0.08 |
| Vitamin C (µg/mL) | 3131±356.5 | 1265±7.73 | 890.2±18.44 | 856.0±13.87 | 264.9±4.44 | 246.2±2.36 |

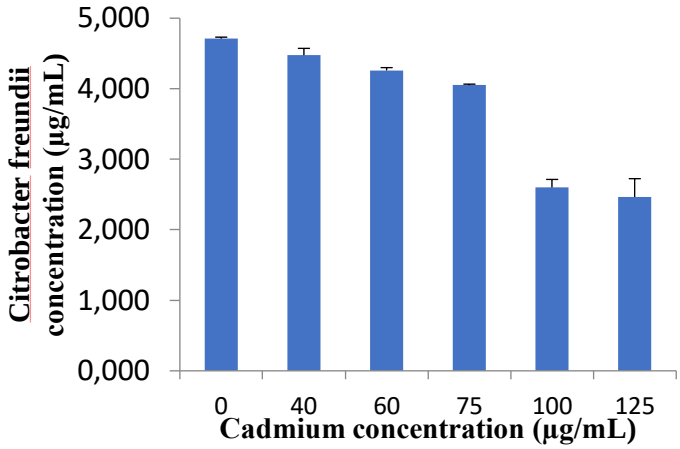



**Figure 2** *C.freundii* concentrations at varying cadmium concentration

**Cadmium Effect on WaterSolubleVitamins**

Vitamins are important micronutrients that are often precursors to enzymes, that all living cells require for biochemical reactions. Water soluble vitamins serves as coenzymes that typically transport specific chemical groups (Qing Gu & Ping Li 2016).

Vitamin B1 (thiamine) is a cofactor for so many enzymes, including pyruvate dehydrogenase and α-ketoglutarate dehydrogenase, which are both involved in the bacterial tricarboxylicacid cycle(Frank et al 2007). In this study, the presence of cadmium has significantly decrease the level of vitamin B1 in *C.freundii*when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mLgroups were compared with control ($p<0.05$) (table 1 and figure 3). The amount of vitamin B1 in *E.coli* was reported to be 7.4µg/g of dryweight (John 1983) while in *C.freundii* was found to be 26.0µg/mL (table 1).

Flavinadeninedinucleotide and Flavinmononucleotide are the two active forms of Vitamin B2(riboflavin). They are cofactors for enzymatic reactions in the TCA cycle and in fatty acid oxidization. This reactions are important for energy release (Ashoori & Saedisomeolia 2014). The present work shows a significant decrease in the amount of Vitamin B2 when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control ($p<0.05$) (table 1 and figure 3). However, the amount of vitamin B2 in *E.coli* was reported to be 310µg/g of dryweight (John 1983) while in *C.freundii* was found to be 1.20µg/mL (table 1).

Vitamin B3 (niacin) happened to be a precursor of an important coenzyme in the cellular redox reaction, nicotinamide adenine dinucleotide, which plays a key role in aerobic respiration(Yoshii et al 2019). In this study, when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control, a significant decrease in the amount of Vitamin B3 was observerd ($p<0.05$) (table 1 and figure 3). The amount of vitamin B3 in *E.coli* was reported to be 450µg/g of dryweight (John 1983) while in *C.freundii* was found to be 362.1µg/mL (table 1).

Vitamin B5 (pantothenic acid) is a precursor of coenzyme A, which is an essential cofactor for the TCA cycle and fatty acid oxidation(Kennedy 2016). The amount of Vitamin B5 was seen to decrease significantly when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control ($p<0.05$) (table 1, figure 3). The amount of vitamin B3 in *E.coli* was reported to be 170µg/g of dryweight (John 1983) while in *C.freundii* was found to be 3324µg/mL (table 1).

Vitamin B6 exists in a variety of forms which includes: pyridoxine, pyridoxal, and pyridoxamine. These forms of vitamin B6 are precursors of the coenzymes pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate, that are involved in a variety of cellular metabolic processes, such as amino acid, lipid, and carbohydrate metabolism (Parra et al 2018). The present study shows a significant decrease in the level of vitamin B6 when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control ($p<0.05$) (table 1, figure 4). The amount of vitamin B6 in *E.coli* was reported to be 6300µg/g of dry weight (John 1983) while in *C.freundii* was found to be 2.40µg/mL (table 1).

Vitamin B9 (folate), in its active form as tetrahydrofolate, is a cofactor in several metabolic reactions, including DNA and amino acid synthesis (Said 2013). The level of Vitamin B9 in this study significantly decrease when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control ($p<0.05$) (table 1, figure 4). The amount of vitamin B9 in *E.coli* was reported to be 1.1µg/g of dry weight (John 1983) while in *C.freundii* was found to be 20.53µg/mL (table 1).

Vitamin B12 (cobalamin) is a cobalt-containing vitamin that, in its active forms of methylcobalamin and adenosylcobalamin, catalyzes methionine synthesis. Together with vitamin B6 and B9, vitamin B12 plays important roles in red blood cell formation and nucleic acid synthesis (Bito& Watanabe 2016). The present study indicates a significant decrease in the concentration of Vitamin B12 when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control ($p<0.05$) (table 1, figure 4). The amount of vitamin B12 in *K.pneumoniae* was reported to be 135ng/g of dry weight (Sylvia &Bernward 1994) while in *C.freundii* was found to be 1.72µg/mL (table 1). A similar study on *C.freundii* also shows that vitamin B12 content to be 152ng/g of dry weight (Sylvia & Bernward 1994).

Vitamin C has an antioxidative effect. It is an electron donor and shows a reducing ability when found in the medium and therefore has the power to neutralize superoxide and hydroxyl radicals, thereby protecting the cell from oxidative damage (Muhammad et al 2014).In this study, a significant decrease in the amount of vitamin C was seen when 40, 60, 75, 100 and 125µg/mL groups were compared with control ($p<0.05$) (table 1 and figure 4).

The highest effect of cadmium on the vitamin levels was seen at 100 and 125 µg/mL (table 1, figure 3 and figure 4). The bacterial concentration was also seen to be more affected at this cadmium concentration 100 and 125 µg/mL (table 1 andfigure 2).

## CONCLUSION

Due to increased addition of heavy metals to the environment, pollution by this metals has become a serious problem and of great concern to the world. Heavy metalssuch as cadmiumare not readily absorbed or captured by microorganisms and as such become a great danger to aquatic and environmental system. Isolating bacteria capable of bioaccumulating this heavy metals has become a focus of research for scientist around the globe. The present study shows the ability of *C.freundii* to grow under cadmium stress which indicates its potential to be useful in bioremediation of the metal.

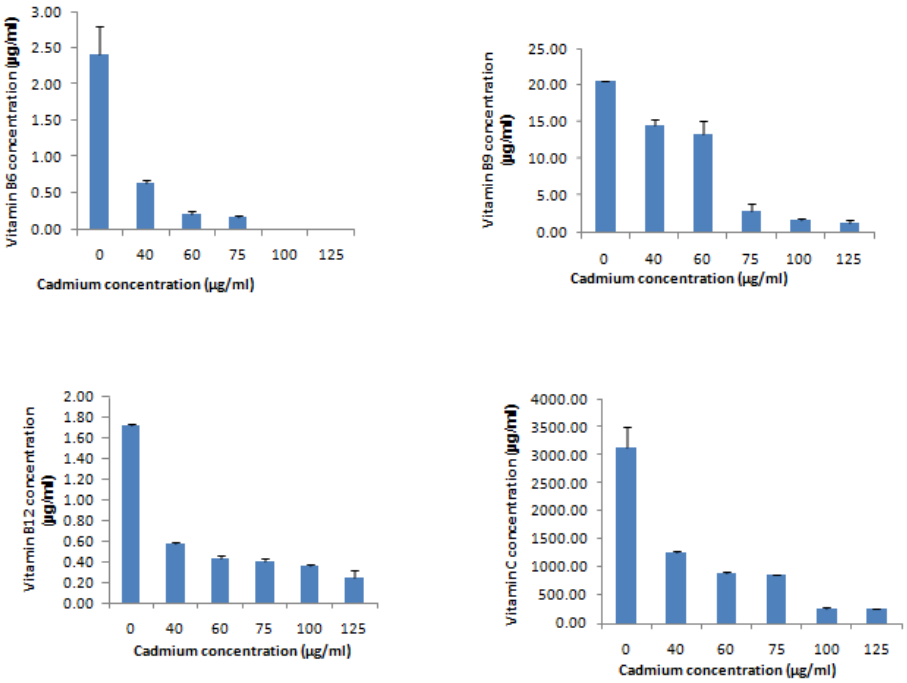



**Figure 3**. Concentrations of Vitamin B1, B2, B3 and B5 at different Cadmium level.

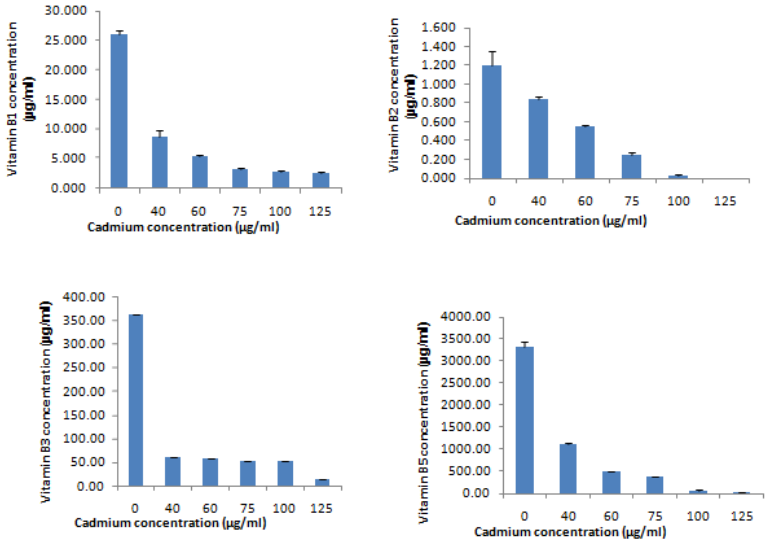



**Figure 4**. Concentrations of Vitamin B6, B9, B12 and C at different Cadmium level.

**REFERENCES**

Amidzic R, Brboric J, Cudina O, Vladimirov S (2005) RP-HPLC determination of vitamins B1, B3, B6, folic acid and B12 in multivitamin tablets. J Serb ChemSoc 70(10):1229–1235

Ashoori M, Saedisomeolia A (2014) Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. Br J Nutr 111:1985–1991

Bradl, H,editor (2002).Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation Volume 6. London: Academic Press.

Bito T and Watanabe F (2016).Biochemistry, function, and deficiency of vitamin B12 in Caenorhabditis elegans. ExpBiol Med. 241:1663–8. doi: 10.1177/1535370216662713

Duffus JH (2002). Heavy metals-a meaningless term? Pure Appl Chem.; 74(5):793–807.

Frank RAW, Leeper FJ, Luisi BF (2007).Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. Cell Mol Life Sci. 64:892–905. doi: 10.1007/s00018-007-6423-5

He ZL, Yang XE, Stoffella PJ (2005) Trace elements in agro ecosystems and impacts on the environment. J Trace Elem Med Biol.; 19(2–3):125–140. [PubMed: 16325528]

Ivanovic D, Popovic A, Radulovic D, Medenica M (1999) Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some watersoluble vitamins in pharmaceuticals. J Pharm Biomed Anal 18: 999–1004

John a. Leigh (1983).Levels of water-soluble vitamins in methanogenic and non- methanogenic bacteria. Applied and environmental microbiology. p. 800-803 vol. 45, no. 3

J Sharma, MH Fulekar (2009). Potential of *Citrobacterfreundii*for bioaccumulation of heavy metal – copper. Journal of Biology and Medicine, 1 (3): 7-14.eISSN: 09748369

Kennedy DO (2016). B Vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review.Nutrients. 8:68. doi: 10.3390/nu8020068

Muhammad I, Ashiru S, Ibrahim DI, Kanoma AI, Sani I, Garba S (2014) Effect of ripening stage on vitamin C content in selected fruits. Int J Agriculture, Forestry and Fisheries 2(3):60–65

ParraM, Stahl S, Hellmann H (2018). Vitamin B6 and its role in cell metabolism and physiology.Cells. 7:84. doi: 10.3390/cells7070084

Patlolla A, Barnes C, Yedjou C, Velma V, Tchounwou PB (2009). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague Dawley rats. Environ Toxicol.; 24(1):66–73. [PubMed: 18508361]

Patlolla A, Barnes C, Field J, Hackett D, Tchounwou PB (2009). Potassium dichromate-induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. Int J Environ Res Public Health.; 6:643–653. [PubMed: 19440407]

Qing Gu and Ping Li (2016). Biosynthesis of Vitamins by Probiotic bacteria. Open access peer revived. DOI: 10.5772/63117

RafatiRahimzadeh, M., RafatiRahimzadeh, M., Kazemi, S., &Moghadamnia, A. A. (2017). Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian journal of internal medicine*, *8*(3), 135–145. https://doi.org/10.22088/cjim.8.3.135

Said HM (2013). Recent advances in transport of water-soluble vitamins in organs of the digestive system: a focus on the colon and the pancreas. Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol. 305:G601–
10. doi: 10.1152/ajpgi.00231.2013

Sutton DJ, Tchounwou PB (2007). Mercury induces the externalization of phosphatidylserine in human proximal tubule (HK-2) cells. Intl J Environ Res Public Health.; 4(2):138 144.

Sylvia Keuth and BernwardBisping (1994). Vitamin B12 production by citrobacterfreundii or klebsiella pneumonia during tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by pcr. applied and environmental microbiology, may 1994, p. 1495-1499 vol. 60, no. 5

Tavazzi B, Lazzarino G, Di-Pierro D, Giardina B (1992) Malondialdehyde production and ascorbate decrease are associated to the perfusion of the isolated postischemic rat heart. Free RadicBiol Med 13:75–78

Tchounwou PB, Centeno JA, Patlolla AK. Arsenic toxicity, mutagenesis and carcinogenesis – a health risk assessment and management approach. Mol Cell Biochem. 2004; 255:47–55. [PubMed:14971645]

Tchounwou PB, Ishaque A, Schneider J (2001). Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. Mol Cell Biochem.; 222:21–28. [PubMed: 11678604]

Yedjou CG, Tchounwou PB (2006). Oxidative stress in human leukemia cells (HL-60), human liver carcinoma cells (HepG2) and human Jerkat-T cells exposed to arsenic trioxide. Metal Ions Biol Med.; 9:298–303.

Yedjou GC, Tchounwou PB (2008). N-acetyl-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. Intl J Environ Res Public Health.; 4(2):132–137.

Yoshii K, Hosomi K, Sawane K and Kunisawa J (2019).Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. Front. Nutr. 6:48. doi: 10.3389/fnut.2019.00048

# Boron levels in bottled waters in Turkey

Ruya Kuru[1*], Sahin Yilmaz[2], Ozlem Sacan[3], Refiye Yanardag[3], Aysen Yarat[1], Fikrettin Sahin[2]

[*1]Marmara University, Faculty of Dentistry, Basic Medical Sciences, Biochemistry, Istanbul, Turkey.

[2]Yeditepe University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Genetics and Bioengineering, Istanbul, Turkey.

[3]Istanbul University-Cerrahpasa, Faculty of Engineering, Department of Chemistry, Istanbul, Turkey.

[*]Corresponding author e-mail: dyt.ruyakuru@gmail.com

## Abstract

Boron is an element found as compounds in nature. In recent studies, boron has been shown to have important roles on human health. However, some studies have shown that high doses of boron have some negative effects. It is known that boron concentration in water and foods directly reflects the exposure of boron for humans. Turkey has a majority of the world's boron reserves. However, the data about boron contents of bottled water in Turkey are also insufficient. Boron levels, in bottled waters of 100 different brands frequently consumed in 36 cities of Turkey, have been determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry. The boron levels ranged between 0.000 and 0.467 mg/L. The overall mean value was around 0.031 mg/L. This value was much lower than the limit levels given by the World Health Organization (2.4 mg/L) and the European Union (1 mg/L), and also the limit level established by Turkish regulations (1 mg/L). To our knowledge, this is the most detailed studies related to Turkey's boron levels in bottled waters. The results of this study are crucial for determining human exposure to boron and providing data to epidemiological studies and creating a drinking water boron database.

**Keywords:** boron, drinking water, bottled water, ICP-MS, trace elements, Turkey

## INTRODUCTION

Boron is not found as an element in nature. It has a high affinity with oxygen. Thus, it is known that there are more than 250 boron compounds in the soil, air, and water (Helvaci 2017). Many of the world's boron reserves are in Turkey. It has a wide range of uses, from cleaning agents to space technology (Kuru and Yarat 2017a). Therefore, boron is named as "white gold" and "salt of industry" in Turkey (Kuru and Yarat 2017b; UCTEA 2016). Recently, the positive effects of boron on human health have been reported in many studies. It has been shown that boron accelerates wound healing (Demirci et al., 2015), regulates energy metabolism (Aysan et al., 2013) mineral metabolism (Hakki et al., 2010), strengthens the immune system (Routray and Ali 2016), shows antioxidant effects (Kucukkurt et al., 2015), reduces cancer risk (Scorei and Popa 2013; Mahabir et al., 2008), enhances mental performance (Nielsen and Penland 2006). However, some studies have shown that high dosed boron will have negative effects on human health (WHO 2017; Robbins et al., 2008).

United States Institute of Medicine, Food and Nutrition Board (2001) has determined the tolerable upper intake level of boron as 20 mg/day for adults. The World Health Organization (WHO) (2017) has determined the safe intake level of boron as 28 mg boron/day for a person of 70 kg. The European Union (EU) has determined a tolerable upper intake level of 10 mg/day (Nielsen and Meacham 2011). EFSA (2013) has determined the Acceptable Daily Intake for boron as 0.16 mg boron/kg/day. However, to date, the recommended dietary allowance and the toxic oral reference dose of boron could not be established due to limited exposure studies.

It is known that boron is mainly taken into the body with nutrients and drinking water (Nielsen 2018). The maximum acceptable value for the concentration of boron in drinking water was established 2.4, 1, and 1 mg/L by the WHO (2017), EU, and Turkey (Baskan and Atalay 2014), respectively. Due to the insufficient data on the harmful effects of boron on health and due to the difficulty and cost of drinking water purifying, some countries accept a higher value than this limit values (Baskan and Atalay 2014).

In view of the possible effects of boron on human health, determining the level of boron in drinking water is very important for protecting and improving public health. Furthermore, the determination of drinking water boron levels will help to evaluate the effects of boron on health more accurately. Today, bottled water is also used as a drinking water to much. The aim of this study is to determine boron levels of bottled water in Turkey by inductively coupled-plasma mass spectrometry (ICP-MS) method and to provide important data for public health and future epidemiological studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection

In this study, totally 149 bottled water samples of 100 different brands frequently consumed in 36 cities of Turkey were obtained from the local markets. These samples were stored in tightly sealed polyethylene bottles and kept in a shaded area at room temperature until analysis.

### Determination of boron level by ICP-MS

For the ICP-MS analysis, 14 mL of each bottled water sample was taken and 0.4 mL of concentrated nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany) was added. Then, these samples were filtered. Each filtrate was taken into the falcon tube. All samples were placed in the auto sampler unit of the ICP-MS instrument (Thermo Scientific X Series 2 ICP-MS; power, 1051 W; nebulizer gas, 1.2 L/min; cooling gas, 13 L/min; auxiliary gas, 0.9 L/min). Calibration solutions were prepared at eight different boron concentrations between 0.2 µg/L - 20 mg/L using the boric acid solution (1000 mg/L, Chem Lab, Zedelgem, Belgium). All analyses were repeated at least three times. In all experiments, all reagents were analytical grade and to avoid contamination, disposable and boron-free materials were used.

## RESULTS and DISCUSSION

In the present study, the boron levels of bottled water samples were given in Table 1. The range was between 0.000 and 0.467 mg/L. The overall mean value was around 0.031 mg/L. This value is much lower than the limits determined by WHO (2017) (2.4 mg/L), EU, Turkey, South Korea, Japan (1 mg/L), Australia (4 mg/L) (Baskan and Atalay 2014).

Today, most people living in cities prefer bottled water, it is generally considered healthier and safer than tap water. The boron level of bottled water therefore greatly may affect public health. However, there are a limited number of studies in the literature regarding the boron content of bottled water. In a study, conducted in Turkey, the boron level of 60 bottled water samples has been ranged between 0.004 and 1 mg/L. The mean boron level, which was higher than ours, has been found to be 0.137 mg/L (Guler 2017).

Studies on boron levels in waters in Turkey have been done generally carried out in tap waters of boron production areas. In a study conducted in Turkey, boron levels of tap waters in the boron-rich region (Kutahya city-Hisarcık village) have been determined as 1.70 mg/L (Col and Col 2003). Korkmaz et al. (2011) have determined the boron levels of tap waters in the boron-rich region (Balikesir city-Bigadic county) and have found them between 1.42 and 6.51 mg/L. In another study, conducted in Turkey, the boron level of tap waters have been found between 0.2 and 29 mg/L in boron-rich regions (Balikesir, Bursa, Kutahya, and Eskisehir cities) (Sayli et al., 1998). As expected, the drinking water boron levels in these studies since they have been done in the boron-rich areas, were higher than the boron level of bottled water samples included in our study.

**Table 1.** The mean boron levels in bottled waters

| City Name | n | Brand | Boron (mg/L) | City Name | n | Brand | Boron (mg/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Adana | 1 | Dalga | 0.016 | Istanbul | 1 | Gumuspinar | 0.001 |
| | 1 | Hayat | 0.009 | | 1 | Güzelpinar | 0.072 |
| Adiyaman | 1 | Sersu | 0.002 | | 1 | Hamidiye | 0.024 |
| Agri | 3 | Su Tanesi | 0.003 | | 1 | Hisar | 0.033 |
| Ankara | 1 | Jav | 0.012 | | 1 | Kuvars | 0.004 |
| Antalya | 1 | Anamur | 0.011 | | 1 | Mayadag | 0.000 |
| | 1 | Manavgat | 0.018 | | 1 | Ozkayisdag | 0.002 |
| Aydin | 1 | Kaltun | 0.008 | | 1 | Ozpinar | 0.024 |
| | 2 | Sirma su | 0.429 | | 1 | Ulupinar | 0.021 |
| | 1 | Pursu | 0.001 | Kahramanmaras | 1 | Marsu | 0.030 |
| Bartin | 2 | Niksar | 0.096 | Karabuk | 6 | Kayın | 0.045 |
| | 1 | Selen | 0.086 | Kayseri | 1 | Atlantis | 0.015 |
| Bingol | 1 | Binpinar | 0.054 | Kirsehir | 2 | Badempinari | 0.193 |
| Bolu | 3 | Assu | 0.003 | Kocaeli | 2 | Abant | 0.001 |
| Bursa | 1 | Alacam | 0.008 | | 2 | Cene su | 0.002 |
| | 2 | Aroma Omer Durak | 0.000 | | 1 | Kipa | 0.009 |
| | 1 | Dinc | 0.000 | | 1 | Meva | 0.004 |
| | 1 | Erikli | 0.001 | | 2 | Yuvacik | 0.004 |
| | 2 | Gumus | 0.000 | Kutahya | 2 | Dinc | 0.007 |
| | 2 | Kay | 0.001 | | 1 | Gurpinar | 0.006 |
| | 1 | Koru | 0.000 | | 1 | Turkmen | 0.025 |
| | 2 | Muradiye | 0.004 | Malatya | 2 | Erkenek | 0.005 |
| | 1 | Nestle | 0.008 | | 1 | Ilya | 0.003 |
| | 2 | Ozkaynak | 0.001 | Manisa | 2 | Frida | 0.002 |
| | 1 | Pinar | 0.000 | Mardin | 2 | Karlica | 0.014 |
| | 1 | Rioba | 0.000 | Osmaniye | 1 | Ideal | 0.006 |
| | 1 | Sultan | 0.000 | Rize | 1 | Azersu | 0.000 |
| | 2 | Uludag | 0.002 | Sakarya | 1 | Akyudum | 0.012 |
| | 1 | Uludag Premium | 0.000 | | 2 | Buzdagi | 0.012 |
| Diyarbakır | 1 | Hamravat GAP | 0.007 | | 1 | Carrefour | 0.002 |
| Duzce | 1 | Assu | 0.001 | | 1 | Carrefour-Discount | 0.005 |
| | 3 | Asya | 0.003 | | 1 | Damla | 0.001 |
| Elazig | 1 | Damla | 0.007 | | 2 | Elmacik | 0.004 |
| Erzurum | 3 | Desni | 0.021 | | 1 | Fuska | 0.001 |
| | 1 | Doyum | 0.013 | | 1 | Hayat | 0.003 |
| | 1 | Mecidiye | 0.013 | | 2 | Kardelen | 0.008 |
| | 1 | Salda | 0.017 | | 2 | Lido | 0.002 |
| Eskisehir | 4 | Gecek | 0.012 | | 1 | Pinar | 0.007 |
| | 2 | Kalabak | 0.012 | | 1 | Rioba | 0.008 |
| Giresun | 1 | Erimez | 0.003 | | 1 | Saka | 0.007 |
| | 5 | Fatsu | 0.012 | | 1 | Sırma | 0.003 |
| Istanbul | 1 | Akyudum | 0.009 | Samsun | 3 | Akdag | 0.317 |
| | 1 | Ayazma | 0.012 | Sivas | 3 | Murat | 0.004 |
| | 1 | Bogazkoy | 0.021 | Tekirdag | 1 | Sudem | 0.047 |
| | 1 | Buzdelen | 0.139 | Trabzon | 1 | Bulak | 0.000 |
| | 1 | Camoluk | 0.001 | | 1 | Sumela | 0.000 |
| | 1 | Cilek | 0.011 | Tunceli | 1 | Munzur | 0.000 |
| | 4 | Cobanpinar | 0.024 | Sanliurfa | 1 | Hekim | 0.010 |
| | 1 | Elvin | 0.043 | | 2 | Karacadag | 0.006 |
| | 1 | Esme | 0.000 | Yozgat | 1 | Akyudum | 0.005 |

In a study conducted in Chile, the boron level of 22 bottled water samples has been ranged between 0.001 and 12.2 mg/L. The mean boron level has been found to be 2.49 mg/L (Cortes et al., 2011). Misund et al. (1999) have determined the boron level of 56 bottled water samples consumed in Europe by the ICP-AES method. They have found the boron level was between 0.005 and 10.1 mg/L. These differences might have arisen from the differences in the numbers of samples, analysis methods, and geographical regions.

According to our study, assuming that an adult drinks 2 liters of bottled water per day, the amount of daily boron intake will be about 0.062 mg. This is also less from the limit values mentioned above. In our previous study, we showed that the amount of daily nutritional boron intake was 1.45 ± 0.4 mg (Kuru et al., 2018). These results show that tolerable upper intake levels by the United States Institute of Medicine, Food and Nutrition Board (2001) (20 mg/day) and WHO (2017) (28 mg/day) cannot be exceeded through daily drinking water and foods.

## CONCLUSION

In the present study, the mean boron level of bottled waters was found to be 0.031 mg/L. This value was well below the limit values determined for boron in drinking water. The results of this study will provide a database to accurately evaluate the effects of boron on public health. However, as seen in the literature, drinking water boron levels are in a highly variable range. Moreover, the number of studies on this issue is rather limited. More detailed studies on the boron level and its relationship with health should be done and boron databases should be created all over the world.

## REFERENCES

Aysan E, Sahin F, Telci D, Erdem M, Muslumanoglu M, Yardımcı E, Bektasoglu H 2013. Mechanism of body weight reducing effect of oral boric acid intake. International Journal of Endocrinology, 2013: 1-5.

Baskan MB, Atalay N 2014. Boron contamination in drinking-irrigation water and boron removal methods. Pamukkale University Journal of Engineering Sciences, 20: 78-84.

Col M, Col C 2003. Environmental boron contamination in waters of Hisarcik area in the Kutahya province of Turkey. Food and Chemical Toxicology, 41: 1417-1420.

Cortes S, Delgado ER, Sancha AM, Ferreccio C 2011. Boron exposure assessment using drinking water and urine in the north of Chile. Science of the Total Environment, 410: 96-101.

Demirci S, Dogan A, Karakus E, Halici Z, Topcu A, Demirci E, Sahin F 2015. Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. Biological Trace Element Research,168: 169-180.

EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Scientific opinion on the re-evaluation of boric acid (E 284) and sodium tetraborate (borax) (E 285) as food additives. Available at: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3407 [09.04.2020]

Guler C 2007. Evaluation of maximum contaminant levels in Turkish bottled drinking waters utilizing parameters reported on manufacturer's labeling and government-issued production licenses. Journal of Food Composition and Analysis, 20: 262-272.

Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki E 2010. "Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 24: 243-250.

Helvaci C 2017. Borate deposits: An overview and future forecast with regard to mineral deposits. Journal of Boron, 2: 59-70.

Korkmaz M, Yenigun M, Bakırdere S, Ataman OY, Keskin S, Müezzinoğlu T 2011. Effects of chronic boron exposure on semen profile. Biological Trace Element Research, 43: 738-750.

Kucukkurt I, Ince S, Demirel HH, Turkmen R, Akbel E, Celik Y 2015. The effects of boron on arsenic-induced lipid peroxidation and antioxidant status in male and female rats. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 29: 564-571.

Kuru R, Yarat A 2017a. Boron and a current overview of its effects on health. Clinical and Experimental Health Sciences, 7: 107-114. (in Turkish).

Kuru R, Yarat A 2017b. Is boron a miracle?. Farmakope, 2: 6-9. (in Turkish).

Kuru R, Mutlu EK, Cempel E, Celik SB, Yarat A 2018. Evaluation of dietary boron in terms of health: a retrospective study. Clinical and Experimental Health Sciences, 8: 296-300.

Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Dong YQ, Eastham C, Forman MR 2008. Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. American Journal of Epidemiology, 167: 1070-1080.

Misund A, Frengstad B, Siewers U, Reimann C 1999. Variation of 66 elements in European bottled mineral waters. Science of the Total Environment, 243-244: 21-41.

Nielsen FH 2018. Historical and recent aspects of boron in human and animal health. Journal of Boron, 2: 153-160.

Nielsen FH, Meacham SL 2011. Growing evidence for human health benefits of boron. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 16: 169-180.

Nielsen FH, Penland JG 2006. Boron deprivation alters rat behavior and brain mineral composition differently when fish oil instead of safflower oil is the diet fat source. Nutritional Neuroscience, 9: 105-112.

Robbins WA, Wei F, Elashoff DA, Wu G, Xun L, Jia J 2008. "Y: X sperm ratio in boron-exposed men." Journal of Andrology, 29: 115-121.

Routray I, Ali S 2016. Boron induces lymphocyte proliferation and modulates the priming effects of lipopolysaccharide on macrophages. PLoS One, 11: e0150607.

Scorei RI, Popa R 2013. Sugar-borate esters-potential chemical agents in prostate cancer prevention. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 13: 901-909.

Sayli BS, Tuccar E, Elhan AH 1998. An assessment of fertility in boron-exposed Turkish subpopulations. Reproductive Toxicology, 12: 297-304.

UCTEA (The Union of Chambers of Turkish Engineers and Architects), 2016. Boron report. Available at: http://www.spo.org.tr/resimler/ekler/65448651842b40f_ek.pdf [11.04.2020] (in Turkish).

United States Institute of Medicine, Food and Nutrition Board 2001. Boron. In: Trumbo P, Ayates A, Schlicker S, Poos M (eds), Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington: pp. 294-301.

WHO (World Health Organization), 2017. Guidelines for drinking-water quality: first addendum to the fourth edition. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442376/ [09.04.2020]

# Juglon yüklü kitosan doku iskelesi üretimi ve karakterizasyonu

Nilbeste BONCUKÇU[1]*, Serap DERMAN[1]

*[1]Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: bekiroglu.nilbeste@gmail.com

## Özet

Osteoartrit, kondrosit apoptozu ve kıkırdak matriks yıkımıyla karakterize bir eklem rahatsızlığıdır. Osteoartritin serbest radikallerle ve reaktif oksijen türleriyle belirgin bir ilişkisi olduğu ortaya konmuştur. Mevcut çalışmada osteoartrit tedavisi için antioksidan aktiviteye dayalı bir doku mühendisliği yaklaşımı önerilmiştir. Bu amaçla juglon yüklü PLGA nanopartiküller üretilerek bu partiküller kitosan doku iskelesine yüklenmiştir. Üretilen doku iskelesi; porözitesi, şişme davranışı, fonksiyonel grupları ve antioksidan aktivitesi açısından karakterize edilmiştir. Çalışma sonunda çapraz bağlı, sulu ortamda şişme davranışı gösteren, %60.7 poröziteye sahip bir doku iskelesi elde edilmiştir. Bu iskelenin antioksidan aktivitesi DPPH ile yüzde inhibisyon üzerinden ölçülerek tespit edilmiştir. Bu çalışmayla osteoartritin antioksidan aktivite üzerinden hedeflenerek tedavisi için bir doku iskelesi tasarlanmıştır. İskelenin özellikleri ayarlanabilir nitelikte olup modifiye edilerek birçok farklı hastalık için ileri çalışmalar yapılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Juglon, poli(laktik-*ko*-glikolik asit), kitosan, sodyum tripolifosfat, doku iskelesi, nanopartikül, osteoartrit, antioksidan aktivite

## Production and characterization of juglon loaded chitosan tissue scaffold

## Abstract

Osteoarthritis is a joint disease characterized with chondrocyte apoptosis and cartilage matrix degradation. It is proved that the disease is related with free radicals and reacive oxygen species. In this study, a tissue engineering approach based on antioxidant activity for treatment of osteoarthritis is suggested. For this purpose, juglone loaded PLGA nanoparticles are produced and integrated with chitosan tissue scaffold. The produced scaffold is evaluated in terms of porosity, swelling behavior, functional groups and antioxidant activity. A crosslinked scaffold, capable of swell in aqueous medium with 60.7% porosity is produced. Antioxidant activity of this scaffold is measured by DPPH method, via inhibition percentage. As a result of the study, a tissue scaffold aiming osteoarthritis through antioxidant activity is designed. This scaffold has a potential to perform further studies for different diseases with modifications since it has tunable properties,

**Keywords:** Juglone, poly(lactic-co-glycolic acid), chitosan, sodium tripoly phosphate, tissue scaffold, nanoparticle, oseoarthritis, antioxidant activity

## GİRİŞ

Osteoartrit eklemlerde kıkırdak, menisküs, subkondral kemik, ligamentler, kapsül ve sinoviyal zar gibi birçok bileşeni tutan, kıkırdak dokunun hücreleri olan kondrositlerde gerçekleşen apoptoz ve matriks metalloproteinaz aktivitesi neticesinde kıkırdak yıkımıyla karakterize bir hastalıktır (Zamli ve Sharif, 2011). Osteoartritin serbest radikallerle ve reaktif oksijen türleriyle belirgin bir ilişkisi olduğu ortaya konmuştur.

Serbest radikaller, son orbitalindeki elektronlardan birini kaybetmiş kararsız atom ya da moleküllerdir. Yarı ömürleri kısa olan bu kararsız atom ya da moleküller, kaybettikleri elektronu tamamlayarak kararlı hale dönmek için başka atom ya da moleküllerle etkileşime girme eğilimindedirler. Oksijen içeren serbest radikaller reaktif oksijen türleri (*reactive oxygen species,* ROS) olarak adlandırılır. Hidroksil radikali ($OH^-$), hidrojen

peroksit ($H_2O_2$), süperoksit anyon ($O_2^-$), nitrik oksit (NO) ve hipoklorit iyonu ($OCl^-$) reaktif oksijen türleridir. Serbest radikaller, hücresel seviyede çoğunlukla; oksidatif fosforilasyonla mitokondriyal olarak, mitokondriyal olmayan, membrana bağlanan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz ile ve ksantin oksidaz ile üretilmekte olup üretilen bu radikallerin önemli biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. Biyolojik ortamda serbest radikaller biyolojik bileşenlerle etkileşime girerek DNA, yağlar, proteinler gibi diğer biyolojik bileşenleri kararsız hale getirerek hem yarı ömürlerini kısaltır hem de DNA hasarı yoluyla hücreleri apoptoza sürükler (Koskenkorva-Frank ve ark., 2013). Bu etkileri ortadan kaldırmak üzere antioksidan moleküller görev yapar. Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin ihtiyacı olan elektronu bu moleküllere sağlayarak kararlı hale getirir ve hücre içinde bu radikallerden kaynaklanabilecek yıkıcı etkilerin önüne geçilmesini sağlar. Hücre içinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, NADPH ubikinon oksidoredüktaz gibi enzimlerin yanı sıra vitamin C ve vitamin E gibi vitaminler de antioksidan aktivite göstererek serbest radikallerin süpürülmesini sağlar (Mobasheri ve ark., 2012). Hücre içinde serbest radikaller ve antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur. ROS üretimiyle antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasına oksidatif stres adı verilir ve bunun neticesinde makromoleküler hasar ortaya çıkar, hücre içindeki redoks sinyali ve kontrolü bozulur (Xu ve Leeuwenburgh, 2015).

Eklem kondrositlerinde düşük seviyede ROS üretimi söz konusudur ve üretilen ROS kondrosit apoptozunu, gen ifadesini, ekstraselüler matriks sentezini/yıkımını ve sitokin üretimini etkileyerek kıkırdak homeostazı için önemli sinyalleri oluşturur (Mobasheri ve ark., 2012; Ziskoven ve ark., 2010). Osteoartritik kıkırdaklarda ROS kaynaklı DNA hasarının normalden fazla olduğu, buna karşın antioksidan enzim miktarının az olduğu tespit edilmiştir ki bu veriler osteoartritte oksidatif stresin rolünü ortaya koymaktadır (Davies ve ark., 2008). Ayrıca oksidatif stresin artmasıyla osteoartrit patogeneziyle ilişkili olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğu neticesinde kıkırdak yıkımının arttığı ve matriks sentezinin azaldığı, sinoviyal enflamasyonun arttığı, subkondral kemik fonksiyon bozukluğunun arttığı, yine mitokondriyal fonksiyon bozukluğu nedeniyle kondrosit apoptozunun ve yaşlanmasının arttığı belirtilmektedir (Lepetsos ve Papavassiliou, 2017). Dolayısıyla osteoartritte oksidatif stresin önüne geçmek için antioksidanların kullanımı mevcut çalışmada önerilmiştir.

Bu antioksidanlardan biri olan juglon (5-hidroksi-1,4-naftokinon), bu özelliğinin yanı sıra antimikrobiyal, antikanser ve antifungal etkileri olan fenolik bir moleküldür. Fenolik bileşenler ROS ile biyomoleküller arasındaki etkileşimi; ROS'ları doğrudan süpürerek, ROS üreten enzimleri inhibe ederek, geçiş metal iyonlarıyla şelat oluşturarak, hidrojen atomu transfer ederek vitamin E'yi yenileyerek engelleyebilme kapasitesine sahiplerdir. Özellikle hidrojen transferi bu noktada serbest radikalleri kararlı hale getirmede büyük önem taşımakta olup juglon da hidroksil ve keto grupları arasındaki moleküller arası hidrojen bağı sayesinde hidrojen vericisi olarak davranarak, ayrıca $Fe^{2+}$ ve $Cu^+$ metal iyonlarına bağlanmak suretiyle bu iyonların serbest radikal üremesini engelleyerek antioksidan özellik göstermektedir (Ahmad ve Suzuki, 2019). Ancak juglonun sudaki düşük çözünürlüğü, biyoyararlanımını azaltmaktadır. Bu nedenle juglonun bir ilaç taşıyıcı sistemle kullanılması hedeflenmiştir.

İlaç taşıma sistemleri; etken maddenin belirli bir bölgede tutulmasını ve sudaki çözünürlüğünün arttırılmasını, böylelikle biyoyararlanımının arttırılmasını sağlayan, etkeni biyolojik ortamdaki enzimatik ve hidrolitik bozunmadan koruyan, etkenin salımını uzun süre boyunca ve kontrollü olarak gerçekleştiren ve salım profilini iyileştiren sistemlerdir. Bu çalışmada juglonu taşıyacak sistem için; insana etkisi kanıtlanmış, toksisitesi olmayan, FDA onaylı, işlenebilirliği kolay olan poli(laktik-*ko*-glikolik asit) (PLGA) tercih edilmiştir. Bu amaçla juglon yüklü PLGA nanopartikülleri ile oluşturulacak ilaç taşıma sistemi, aynı zamanda kıkırdak dokunun taklidi olması amacıyla bir doku iskelesine yüklenmiştir.

Doku iskelesi üretiminde; kitinin kısmi deasetilasyonuyla elde edilen kitosan doğal polimeri, yapısal olarak kıkırdak dokudaki glikozaminoglikanlara (GAG) benzediği için seçilmiş olup kitosan kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilen ve toksik olmayan bir polimerdir (Bhardwaj ve ark., 2011). Ancak kitosanın kıkırdak dokudakine benzer bir mekanik özellik taşıması için kitosan doku iskeleleri genellikle çapraz bağlama ajanlarıyla güçlendirilmektedir. Çalışmada da kitosanın çapraz bağlanması için sodyum tripolifosfat (TPP) ajanı kullanılmıştır.

Özetle, çalışmada osteoartrit tedavisi için antioksidan aktiviteye dayalı bir yaklaşım önerilmiştir. Bu amaçla juglon yüklü PLGA nanopartiküller üretilerek bu nanopartiküller kitosan doku iskelesine yüklenmiştir. Üretilen doku iskelesi; porözitesi, şişme davranışı, fonksiyonel grupları ve antioksidan aktivitesi açısından karakterize edilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Nanopartiküllerin Hazırlanması

Juglon yüklü PLGA nanopartiküller (J-NP), modifiye tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle literatürde yapılan çalışmaya paralel olarak (Arasoğlu ve ark., 2017) üretildi. Bu yönteme göre 40 mg juglon ve 100 mg PLGA (50:50) toplam 3.5 ml DCM'de çözüldü. Elde edilen yağ fazı sonikasyon altında 4 ml %3'lük polivinil alkole (PVA) damlatılarak yağ/su emülsiyonu (*oil-in-water,* o/w) hazırlandı. Emülsiyon, 35 ml %0.1'lik PVA'ya manyetik karıştırma altında damla damla eklendi ve organik fazın uçması için gece boyu oda sıcaklığında karıştırmaya bırakıldı. Bu karışım 3 kere yıkanıp santrifüjlenerek üretilen nanopartiküller pellet halinde toplandı, liyofilize edilip kuru nanopartiküller elde edildi.

### Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

#### *Yükleme Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği, Reaksiyon Verimi*

Kuru nanopartiküller tartıldı, santrifüj sonrası elde edilen üst fazdan UV-Vis spektrofotometre ile juglonun maksimum absorbans verdiği dalga boyu olan 424 nm'de okumalar yapılarak enkapsüle edilemeyen juglon miktarı hesaplandı. Ardından yükleme verimi (1), enkapsülasyon etkinliği (2) ve reaksiyon verimi (3) aşağıdaki denklemlere göre hesaplandı:

$$\%Juglon\ Yükleme\ Verimi = \frac{Enkapsüle\ juglon\ kütlesi}{Elde\ edilen\ nanoparikül\ kütlesi} \times 100 \quad (1)$$

$$\%Enkapsülasyon\ Etkinliği = \frac{Enkapsüle\ juglon\ kütlesi}{Başlangıçtaki\ juglon\ kütlesi} \times 100 \quad (2)$$

$$\%Reaksiyon\ Verimi = \frac{Üretilen\ nanopartikül\ kütlesi}{Başlangıçtaki\ juglon+PLGA\ kütlesi} \times 100 \quad (3)$$

#### *Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi*

Üretilen partiküllerin boyut dağılımı ve yüzey potansiyelleri, sırasıyla dinamik ışık saçılması ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleri kullanılarak ölçüldü. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Kitosan doku iskelesi hazırlanması için, %3'lük kitosan çözeltisi asetik asit kullanılarak hazırlandı. Tamamen çözülene dek karıştırılan çözelti kalıba döküldü, donduruldu ve liyofilize edildi. Liyofilize edilen doku iskeleleri %5'lik TPP çözeltisinde 30 dakika boyunca bekletilerek çapraz bağlanması sağlandı. Ardından distile suyla yıkandı ve yeniden dondurulup liyofilize edilerek çapraz bağlı doku iskelesi hazırlandı.

#### *FT-IR Analizi*

Yüzeydeki fonksiyonel grupların tespitiyle çapraz bağlamanın izlenmesi amacıyla ATR (*attenuated total reflectance*) modunda Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (FTIR) kullanıldı. 4000-650 $cm^{-1}$ dalga sayısı aralığında, 4 $cm^{-1}$ çözünürlükte taranarak çapraz bağlama öncesi ve sonrası bağların değişimi gözlendi.

**Doku İskelesi Karakterizasyonu**

***Yoğunluk ve Porözite Analizi***

Bu iskeleden kübik bir parça kesildi, ayrıtları ölçüldü ve hacmi hesaplandı (V). Aynı parçanın kütlesi (m) de hassas terazide tartılarak ölçüldü. Denkleme (4) göre deneysel yoğunluk ($\rho_d$) hesaplandı:

$$\rho_d = \frac{m}{V} \quad (4)$$

Kitosan doku iskelesi için teorik yoğunluk literatürden bulundu (Naseri ve ark, 2016). Deneysel ($\rho_d$) ve teorik yoğunluk ($\rho_t$) kıyası üzerinden, denkleme (5) göre porözite ($\nu$) hesaplandı:

$$\nu = 1 - \frac{\rho_d}{\rho_t} \quad (5)$$

Yoğunluk ve porözite hesaplamaları çapraz bağlanmamış doku iskeleleri için de aynı şekilde gerçekleştirildi.

***Şişme Analizi***

Çapraz bağlanmış ve bağlanmamış doku iskelelerinden, birbirine denk kübik parçalar kesildi. Her bir ayrıt cetvelle ölçüldü. Kuru iskelelerin kütleleri ($m_0$) tartıldı. Her iki iskele de distile suya atıldı. Ardından belli zaman aralıklarında (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 12, 24 saat) yeniden kütleler tartıldı ($m_1$). Her bir tartım sonrası makro seviyede iskelelerde meydana gelen değişmeler gözlendi. Yüzde şişme oranları aşağıdaki denkleme (6) göre hesaplandı:

$$\%Şişme = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 \quad (6)$$

***Nanopartikül Yüklü Doku İskelesi FT-IR Analizi***

Son olarak, 0.5 mg/ml J-NP süspansiyonu hazırlandı. Doku iskelesi bu süspansiyona batırılarak nanopartiküller iskeleye emdirildi. İskele tekrar liyofilize edilerek nanopartikül yüklü doku iskelesi hazırlandı. İskelenin yüzeydeki fonksiyonel grupları ATR-FTIR ile, 4000-650 $cm^{-1}$ dalga sayısı aralığında, 4 $cm^{-1}$ çözünürlükte taranarak tespit edildi.

**Antioksidan Aktivite Tayini**

Yüklü doku iskelesinin antioksidan aktivitesinin tayini için 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürme yeteneği tespit edildi. Bu yönteme göre 100 µM DPPH çözeltisi kontrol olarak kullanıldı, 517 nm'de UV-Vis ile absorbansı okundu ($A_{DPPH}$). Ardından DPPH ile doku iskelesi etkileştirilip aynı dalga boyunda okuma yapıldı ($A_{Di}$). Denkleme (7) göre yüzde inhibisyon hesaplandı:

$$\%\ İnhibisyon = \frac{A_{DPPH} - A_{Di}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (7)$$

**BULGULAR VE TARTIŞMA**

**Nanopartikül Karakterizasyonu**

Üretilen nanopartiküller için elde edilen boyut, PDI, zeta potansiyel, enkapsülasyon etkinliği, yükleme verimi ve reaksiyon verimi değerleri Tablo 1'de verilmiştir:

**Tablo 1:** J-NP için karakterizasyon verileri

| Ortalama Boyut (Z-ave) (nm) | Çoklu Dağılım İndeksi (PDI) | Zeta Potansiyel (mV) | Enkapsülasyon etkinliği (%) | Yükleme Verimi (%) | Reaksiyon Verimi (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **205.3** | 0.138 | -27.3 | 83.66 | 35.26 | 61.52 |

Çoklu dağılım indeksi ve ortalama boyut değerlerinden, üretilen NP'lerin monodisperse boyut dağılımda olduğunu göstermektedir. Bu değerler, biyolojik uygulamalar için arzu edilen niteliktedir.

**Doku İskelesi Karakterizasyonu**

Çapraz bağlanmamış ve bağlanmış kitosan doku iskelelerinin yoğunluk ve poröziteleri Tablo 2'de verilmiştir.

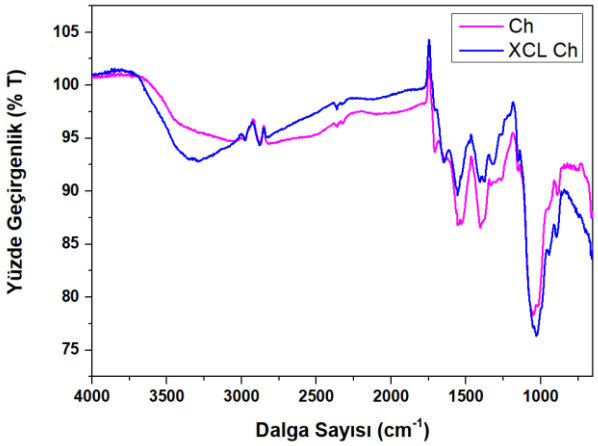
**Tablo 2:** Doku iskelelerinin yoğunluk ve porözite değerleri

| | Çapraz bağlanmamış doku iskelesi | Çapraz bağlı doku iskelesi |
|---|---|---|
| Yoğunluk (g/ml) | 0,077 | 0,092 |
| Porözite (%) | 67.2 | 60.6 |

Tablodaki verilere göre çapraz bağlama sonucunda yoğunluğun arttığı ve porözitenin azaldığı görülmektedir. Çapraz bağlamayla moleküller arasında yeni bağların kurulması neticesinde moleküller birbirine yakınlaşır. Moleküller arası mesafe azaldıkça, birim hacimdeki madde miktarı artar, dolayısıyla doku iskelesinin yoğunluğunun artması beklenen bir durumdur. Aynı yoğunlaşma doku iskelesinin porlarında da gerçekleşir, porların daralması nedeniyle porözitenin azalması da beklenir.

***FTIR Analizi***

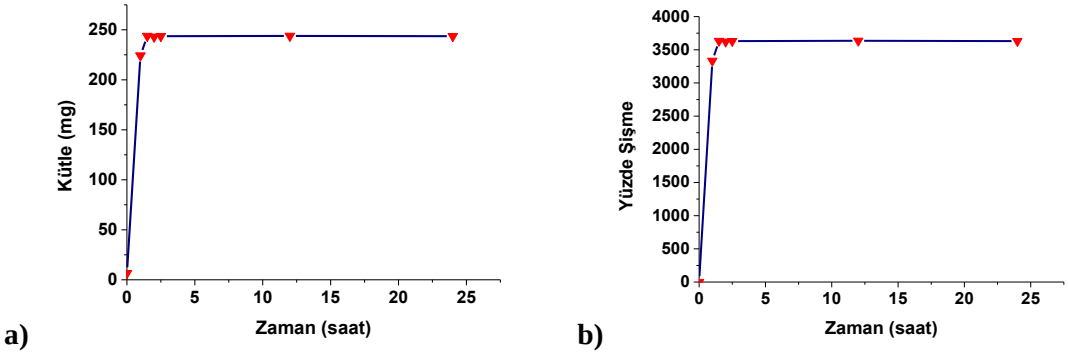
Çapraz bağlanmamış ve bağlanmış kitosan doku iskelelerinin yüzeydeki fonksiyonel gruplarının karşılaştırılması için FTIR spektrumları Grafik 1'de verilmiştir. Yüzde geçirgenlik (%T) olarak elde edilen FT-IR spektrumlarından kitosanın karakteristik bantları tespit edilmiştir. Buna göre her iki spektrum da literatürdeki benzer çalışmalardan elde edilen spektrumlarla paralellik göstermektedir (Pierog ve ark., 2009; Fernandes Queiroz ve ark, 2015). Elde edilen spektrum incelendiğinde 3700-3000 $cm^{-1}$ arasında -$NH_2$ ve -OH gruplarının gerilim titreşiminden kaynaklanan geniş bantta çapraz bağlamadan sonra ciddi bir şiddetlenme görülmektedir. Bu durum, TPP'deki -OH gruplarının çapraz bağlamayla birlikte yapıya katılmasıyla açıklanabilir (Pierog ve ark., 2009).




**Şekil 1.** Çapraz bağlanmamış (Ch) ve çapraz bağlanmış (XCL Ch) kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumu

***Şişme Analizi***

Çapraz bağlanmamış ve bağlanmış doku iskelelerinin şişme davranışları, belirlenen zaman aralıklarında tartımı alınan iskeleler için kütle-zaman (Şekil 2a) ve yüzde şişme-zaman (Şekil 2b) grafiklerinin oluşturulması ile incelenmiştir. Ancak distile suya atıldıktan kısa bir süre sonra çapraz bağlanmamış doku iskelesi dağıldığı için tartım alınamamış, grafik yalnızca çapraz bağlı doku iskelesi üzerinden oluşturulmuştur.



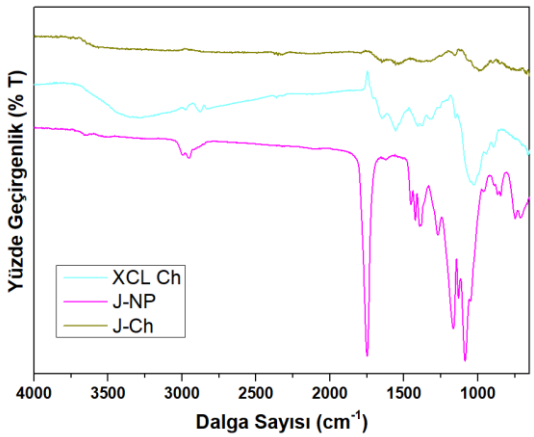

**Şekil 2.** Çapraz bağlı doku iskelesinin kütle-zaman ve yüzde şişme-zaman grafiği

Grafiğe göre çapraz bağlı doku iskelesinin 1 saat içinde alabileceği en fazla su yükünü aldığı ve kütlece dengeye ulaştığı görülmektedir. Liyofilize edildikten sonra opak beyaz bir renkte olan doku iskeleleri distile su ortamına atıldıktan sonra yarı transparan bir görüntü almıştır (veri gösterilmedi). Çapraz bağlanmamış doku iskelesi sulu ortama atıldıktan yaklaşık 1 saat sonra bütünlüğünü kaybetmiş ve parçalanmıştır. Buna karşın çapraz bağlı doku iskelesi bütünlüğünü korumuş ve hacmen %160'ına ulaşmıştır. Bu iskelenin kütlece yüzde şişme oranı ise %3730 olarak tespit edilmiştir. Kitosan doku iskeleleri, kitosanın protonlanmış amin gruplarının su moleküllerine yüksek afinitesi nedeniyle sulu ortamlarda kolaylıkla şişme özelliğine sahiptirler. Bu durum, üretilen doku iskelesinde de görülmüş ve iskelenin hidrojel özellikleri sergileyerek sulu ortamda gösterdiği şişme davranışı başarılı bir şekilde gözlenebilmiştir. Literatür aramasında da benzer sonuçların varlığı görülmüştür (Xu ve ark., 2018).

Yukarıdaki veriler birlikte değerlendirilerek çapraz bağlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği yorumu yapılmıştır.

***Nanopartikül Yüklü Doku İskelesi FT-IR Analizi***

J-NP yüklü kitosan doku iskelesi (yüklü iskele) için alınan FTIR spektrumunda (Şekil 4), çapraz bağlı kitosan doku iskelesinin bantlarından bazılarında sönümleme gerçekleştiği gözlenmektedir. Ayrıca tek başına J-NP'lerin bantlarının yüklü iskelede neredeyse görülmüyor oluşu, FTIR spektroskopisinin malzeme yüzeyindeki fonksiyonel grupları gösteriyor oluşu itibariyle nanopartiküllerin ana olarak malzemenin iç bölgelerinde yoğunlaştığını düşündürmektedir.




**Şekil 4.** Çapraz bağlı kitosan doku iskelesi (XCL Ch), juglon yüklü PLGA nanopartikül (J-NP) ve J-NP yüklü çapraz bağlı kitosan doku iskelesi (J-CH) için FTIR spektrumları.

**Antioksidan Aktivite Tayini**

Nanopartikül yüklü iskelenin antioksidan aktivite tayini, DPPH yöntemiyle ortaya konmuştur. Bu yöntemde DPPH radikalinin süpürülme yani inhibisyon oranına göre H alıcılık kapasitesi, yani antioksidan kapasite ortaya konmaktadır. Yapılan hesaplarla yüklü doku iskelesinin yüzde inhibisyonu %15.31 olarak belirlenmiştir. Burada J-NP'lerin doku iskelesinin iç bölgelerinde yer alması, doku iskelesinde hapsedilmiş nanopartiküllerin içinden juglon salımıyla antioksidan aktivitenin gösterilmesi beklenmektedir. Mevcut çalışmada kullanılan antioksidan aktivite tayini yöntemine göre sıvı ortamla doku iskelesinin temas süresi 30 dakikadır ve bu ortam çalkalamaya tabi tutulmamıştır. Bu durumda juglonun salımı difüzyonla gerçekleşmiştir. Düşünüldüğünde hem nanopartikül yapısının hem de doku iskelesinin kendisi ortamda difüzyon hızını yavaşlatan etmenler arasındadır. Bu durum ilacın uzun süre salımı için olumlu düzenleyici etmenler olsa da bu kısa zaman içinde antioksidan aktivitenin yeterince gösterilememesine neden olacak olumsuz etkili faktörler olarak değerlendirilmektedir. Bu sistemden juglon salım profilinin tespitiyle birlikte söz konusu doku iskelesinin en etkili olduğu süre ve doz belirlendiğinde, uygun salım ortamından antioksidan aktivitenin tayin edilmesi daha gerçekçi bir sonuç verebilir.

## SONUÇLAR

Mevcut çalışmayla osteoartritte meydana gelen serbest radikal üretimine karşı, bu bölgeye yerleştirilecek bir doku iskelesi tasarlanmış ve şişme davranışıyla antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Üretilen doku iskelesinin mevcut özellikleri tedavide kullanılacak kadar yeterli olmamakla birlikte üretimle ilgili parametrelerin değiştirilmesiyle, salım profilinin tespitiyle, doz ayarlaması yapılmasıyla iyileştirilebilir niteliktedir. Oluşturulan sistemde bileşenler değiştirilerek, doku iskelesine farklı elemanlar katılarak veya ilaç taşıma sistemine juglon yanında tedavi hedefleyici farklı etken moleküller de kazandırılarak multifonksiyonel doku iskeleleri tasarlanabilir. Bu çalışmada elde edilen antioksidan aktivite sonuçları umut verici olup *in vitro* ve *in vivo* ek çalışmalarla canlı hücrelerde ve canlı sistemlerdeki verimi tespit edilebilir.

## TEŞEKKÜRLER

Nilbeste BONCUKÇU, "Biyomalzemeler ve Doku Mühendisliği" alanında YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmektedir.

## KAYNAKLAR

Ahmad, T., Suzuki, Y. J. (2019). Juglone in oxidative stress and cell signaling. Antioxidants, 8(4), 91.

Arasoglu, T., Derman, S., Mansuroglu, B., Yelkenci, G., Kocyigit, B., Gumus, B., Kocacaliskan, I. (2017). Synthesis, characterization and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles. Journal of applied microbiology, 123(6), 1407-1419.

Bhardwaj, N., Kundu, S. C. (2011). Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications. Carbohydrate Polymers, 85(2), 325-333.

Davies, C. M., Guilak, F., Weinberg, J. B., & Fermor, B. (2008). Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. Osteoarthritis and cartilage, 16(5), 624-630.

Fernandes Queiroz, M., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sassaki, G. L., Rocha, H. A. O. (2015). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?. Marine drugs, 13(1), 141-158.

Koskenkorva-Frank, T. S., Weiss, G., Koppenol, W. H., Burckhardt, S. (2013). The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. Free Radical Biology and Medicine, 65, 1174-1194.

Lepetsos, P., Papavassiliou, A. G. (2016). ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1862(4), 576-591.

Mobasheri, A., Biesalski, H. K., Shakibaei, M., Henrotin, Y. (2012). Antioxidants and osteoarthritis.

Naseri, N., Poirier, J. M., Girandon, L., Fröhlich, M., Oksman, K., Mathew, A. P. (2016). 3-Dimensional porous nanocomposite scaffolds based on cellulose nanofibers for cartilage tissue engineering: tailoring of porosity and mechanical performance. RSC advances, 6(8), 5999-6007.

Pierog, M., Gierszewska-Drużyńska, M., Ostrowska-Czubenko, J. (2009). Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hydrogel membranes. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. Polish Chitin Society, Łódź, 75, 82.

Xu, Y., Han, J., Chai, Y., Yuan, S., Lin, H., Zhang, X. (2018). Development of porous chitosan/tripolyphosphate scaffolds with tunable uncross-linking primary amine content for bone tissue engineering. Materials Science and Engineering: C, 85, 182-190.

Zamli, Z., Sharif, M. (2011). Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis?. International journal of rheumatic diseases, 14(2), 159-166.

Ziskoven, C., Jäger, M., Zilkens, C., Bloch, W., Brixius, K., Krauspe, R. (2010). Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation?. Orthopedic Reviews, 2(2).

# Determination of selenium in tap water by voltammetry

Kuddusi Karaboduk*

*Gazi University, Life Sciences Application and Research Center, Ankara, Turkey.

*Corresponding author e-mail: kuddusi@gazi.edu.tr

## Abstract

A simple and highly sensitive electrochemical method for the determination of selenium (Se(IV)) was developed, based on an activated palladium (Pd) electrode. In pH 2.0 Britton–Robinson buffer (BR), the activated Pd electrode significantly enhanced the peak current of Se(IV) compared with non activated Pd electrode. The current responses in cyclic voltammetric experiments were investigated and a reduction peak was observed at -0.519 V vs. Ag/AgCl. Several parameters were investigated to evaluate the performance of the development method. Under optimized conditions, the linear range was 1 to 200 ppb for Se(IV), and the detection limit (S/N = 3) was 0.4 ppb. Relative standard deviations of 1.36, 0.57 and 0.74% were obtained for five successive determinations of 5, 7 and 9 ppb Se(IV), respectively. This voltammetric method was successfully applied for the direct determination of Se(IV) in tap water.

**Keywords:** Selenium, voltammetry, palladium electrode, tap water.

## INTRODUCTION

Selenium is a necessary element of the human and mammals (Kieliszek and B1azejak, 2013). Selenium has a critical role in several primary metabolic pathways including thyroid hormone metabolism, immune functions, antioxidant, and defense systems (Kangalgil and Yardımcı, 2017; Pyrzynska and Sentkowska, 2019). Selenium is existing in Earth's crust, and can be entered the food chain through plants or aquatic organisms (Martinez et al., 2018). Seafood, organ meats, cereals, egg, muscle meat, grains, and vegetables are sources of selenium (Kumar and Priyadarsini, 2014).

High level of selenium leads to toxic effect to human and animals (Ullah et al., 2018). Inorganic selenium have more harmful effect than organic selenium in natural water (Açıkkapı et al., 2019). The admissible level of the total selenium in the drinking water is 40 ppb (as per World Health Organization) (Barache et al., 2017). Therefore, achieving determination of selenium has attracted a lot of the attention and a number of the qualitative and quantitative methods have already been developed for the selenium determination such as electrothermal atomic absorption spectrometric (Açıkkapı et al., 2019), spectrophotometric (Barache et al., 2017; Mörschbächer et al., 2018), inductively coupled plasma optical emission spectrometric (Luo et al., 2017), atomic fluorescence spectrometric (Ma et al., 2019), inductively coupled plasma-mass spectrometric (Wang et al., 2018). These development methods may be greatly selective and sensitive; however, they require expensive and complex equipment, time for analysis, excessive use of the chemicals and user experience. Voltammetric techniques and equipment are advisable for fieldwork, because they do not require bulky component and electroanalytical techniques are low cost, and they offer easy operation, high simplicity and short analysis time. Recently, some electrochemical determination methods and electrodes have been developed for Se(IV) analysis such as adsorptive accumulation of Se–$I_2$ on thin mercury film electrode (Ashournia and Aliakbar, 2009), the renewable silver annular band working electrode (Bas et al., 2014), flow-injection anodic stripping voltammetry (Bryce et al., 1995), gold-nanoparticle modified glassy carbon electrode (Idris et al., 2015), Au/ZnO nanocomposites decorated ITO electrode (Jain et al., 2018), glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles (Segura et al., 2015).

Selenium is the common element in environment and high level of selenium is toxic, because of this, determination of selenium is very important. The aim of this study is to develop a simple and sensitive DPV method for the determination of Se(IV), for this reason, activated Pd electrode was used. Se(IV) has been determinated successfully in tap water samples from different region of Ankara.

## MATERIALS AND METHODS

### Experiment

*Chemicals and Apparatus*

All of the reagents were used analytical grade. These reagents involve boric acid (99.99%, Merck), acetic acid (HAc) (ACS reagent, ≥99.7%, Sigma-Aldrich), phosphoric acid (ACS reagent, ≥85%, Sigma-Aldrich), selenium standard solution (1000 mg/L, in $HNO_3$ Merck). Britton-Robinson (B-R) buffer (0.1 M) with different pH values were prepared by convenient mixing of the $H_3PO_4$, $H_3BO_3$, HAc and NaOH. Double distilled water (18.2 MΩ cm) was used in the preparation of the each solution.

PalmSens3 Potentiostat/Galvanostat (PalmSens BV, Netherlands) was used for cyclic voltammetry (CV), chronoamperometry and differential pulse voltammetry (DPV) measurements with a conventional three-electrode system, consisting of the palladium electrode (BASi, MF-2018 (3.0 mm dia.,) West Lafayette, IN 47906 USA), Ag/AgCl reference electrode (BASi, MF-2052, West Lafayette, IN 47906 USA) and platinum wire auxiliary electrode (BASi, MW-1032 (7.5 cm) West Lafayette, IN 47906 USA). The pH values of the solutions were measured using a SevenEasy Mettler Toledo pH-meter.

*Preparation of the Pd electrode*

Pd electrode was mechanically polished with 0.05 μm alumina slurries (BASi, PK-4 Polishing Kit, MF-2060, West Lafayette, IN 47906 USA). Pd electrode was carefully polished. The polished Pd electrode was used with and without using an activation procedure in which Pd electrode was activated at +1.20 V for 60 s in 0.5 M $H_2SO_4$ by chronoamperometry.

*Electrochemical procedure*

The electrochemical behavior of Se(IV) was examined by recording the cyclic voltammogram in B-R buffer (pH 2.0) at a scan rate of 75 mV/s on the non-activated and activated Pd electrode surface. The investigation of the effect of the scan rate on the peak currents and peak potentials, the CV was used to at different scan rates. In addition, the effect of the pH between 2.0 and 7.0 on the peak potentials and current value of the reduction of Se(IV) was also investigated at a scan rate of 75 mV/s.

The supporting electrolytes were degassed by allowing $N_{2(g)}$ to pass through for 10 min before all electrochemical measurements. Tap waters were collected from three different regions of Ankara (February, 2020). The standard addition method was used for to elimination of the matrix effects.

## RESULTS and DISCUSSION

### Electrochemical Behavior of Se on non-activated and activated Pd electrode

To investigate the electrochemical behavior of Se(IV), cyclic voltammetry was used for 80 ppb Se(IV) using non-activated and activated Pd electrodes. Figure 1 shows typical cyclic voltammetry response of Se(IV) at different electrodes in 80 ppb Se(IV) containing pH 2.0 at a scan rate of 75 mV/s.

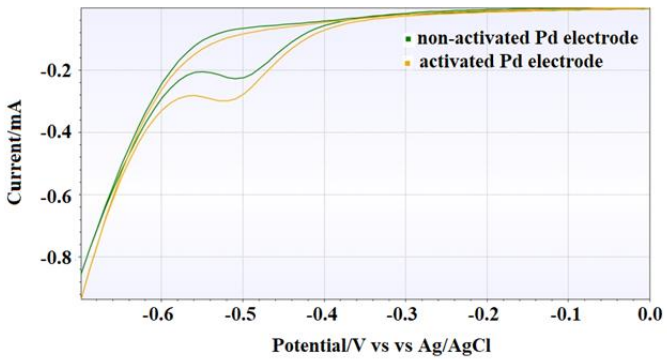



Figure 1. CVs of the non-activated and activated Pd electrode in the presence of 80 ppb Se(IV) in the pH 2.0 BR buffer at a scan rate of 75 mV/s

In the scanning (between 0.0 and -0.7 V), an irreversible reduction peak was observed at about – 0.509 mV and -0.519 V for non-activated and activated Pd electrode, respectively. The current of this irreversible peak

increased by 18% by using the activated Pd electrode, because activation of the Pd electrode offered an effective electrode surface area.

*Optimization of the activation potential of the Pd electrode*

The effect of the activation potential ranging from +1.0 V to +1.4 V on the peak currents of 50 ppb of Se(IV) after 60 s of the activation was investigated. At potentials more positive than +1.2 V, the reduction peak current of selenium remained stable (Figure 2).

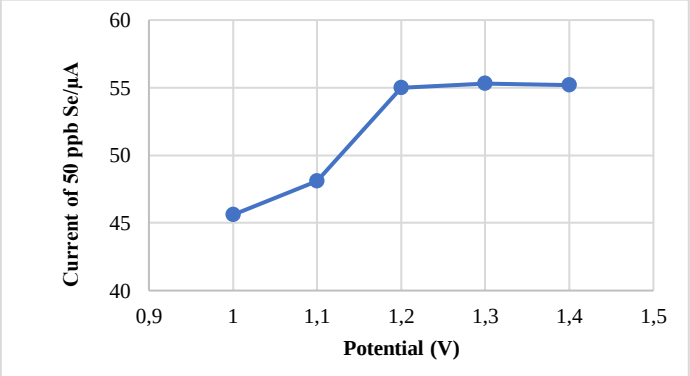



Figure 2. Effect of the activation potential to 50 ppm Se(IV) reduction peak current value

The effect of the activation time for the sample containing 50 ppb Se(IV) in standard conditions was also examined. The current of selenium peak increases linearly with the activation time to 60 s (Figure 3). Deposition time of 60 s was selected because of the short analysis time.

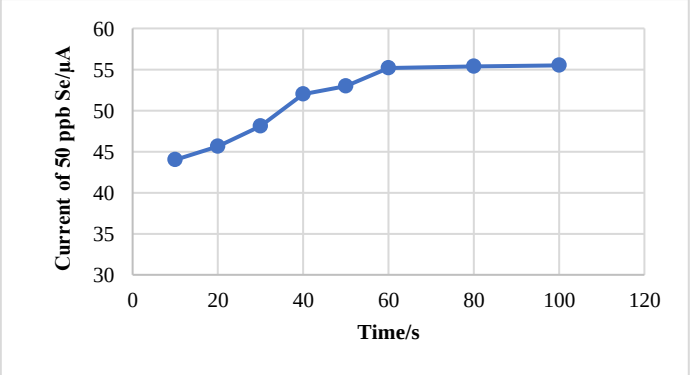



Figure 3. Effect of the activation time to 50 ppm Se(IV) reduction peak current value

**Effect of pH**

The effect of pH of B-R buffer on the voltammetric responses of 80 ppb Se(IV) was also studied for pH values from 2.0 to 7.0, as shown in Figure 4.

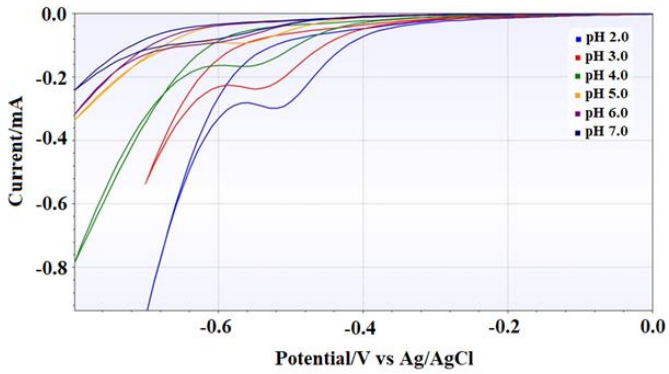



Figure 4. Cyclic voltammograms of 80 ppb Se(IV) on activated Pd electrode at various pH (scan rate: 75 mV/s)

Cathodic peak potential of selenium shifted to negative values with an increase of the pH (from 2.0 to 7.0) and the cathodic peak current of Se(IV) decreased with increasing of the pH. A similar result has also been reported in previously published paper (Jain et al., 2018). Jain et al., showed that, the pH of the supporting electrolyte plays an important role in affecting the ionic state of selenium. In the highly acidic media, maximum reduction peak current was observed.

**Effect of scan rate**

The effect of scan rates (ν) on reduction peak currents of 50 ppb Se(IV) on Pd electrode was studied in the range from 5 to 200 mV/s. It was noticed that the irreversible reduction peak currents increased at higher scan rates. There was a linear relationship between log $i_p$ (µA) and log υ (mV), corresponding to the following equation: log $i_p$ (µA) = 0.4946 log υ (mV/s) – 2.1767; $R^2$= 0.9966 (Figure 5) demonstrates that the electrode process was controlled by diffusion of Se(IV) to the electrode surface. 75 mV/s was used for the selenium determination.

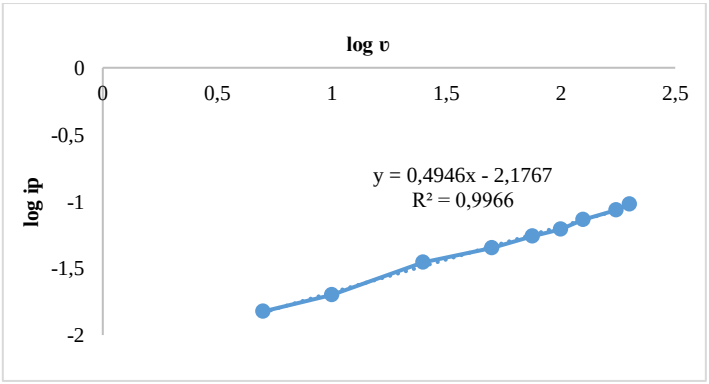



Figure 5. Plot of the logarithm of peak current vs. logarithm of the scan rate

**Linear range and limit of detection**

Investigation of the relationship between the cathodic peak current and the concentration of Se(IV), differential pulse voltammograms were recorded in B-R buffer (pH 2.0). Figure 6 shows the differential pulse voltammograms obtained at Pd electrode for various concentrations of Se(IV). A linear response was observed in the range between 1 and 200 ppb with the linear regression equation given by: $i_p$ = 1.1263C - 0.1144 ($R^2$= 0.9985) (Figure 7).

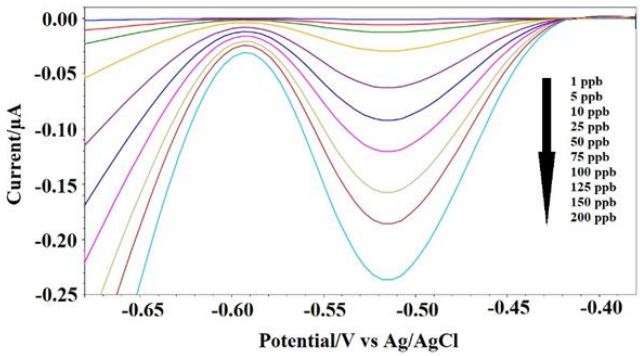



Figure 6. DPVs of selenium at activated Pd electrode in pH 2.0 BR buffer. Scan rate: 75 mV/s

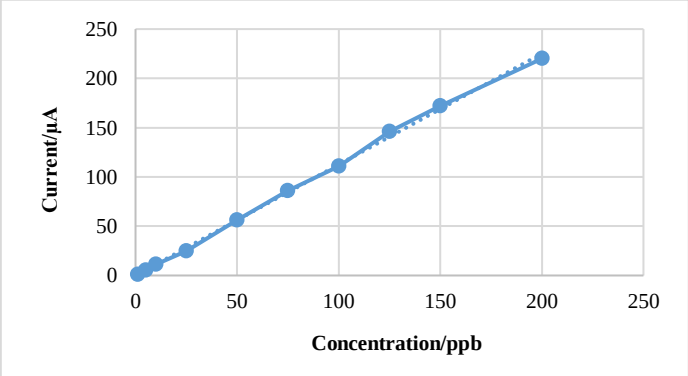



Figure 7. Calibration curve for Se(IV)

The detection limit was estimated to be 0.4 ppb (S/N=3) for Se, which was comparable with the values reported by the other researchers (Table 1).

Table 1. Comparison of the developed method with previously reported voltammetric method for the determination of Se(IV)

| Method | LOD/ppb | Linear range/ppb | Reference |
|---|---|---|---|
| **DPCSV** | 0.37 | | Ashournia and Aliakbar, 2009 |
| **CSV** | 0.15 | 1-10 | Bas et al., 2014 |
| **SWASV** | 0.64 | 1-50.00 | Idris et al., 2015 |
| **SWASV** | 0.120/0.175 | 10-50/15-55 | Segura et al., 2015 |
| **SWASV** | 2.89 | 5-100 | Jain et al., 2018 |

## Synthetic samples analysis

Synthetic samples in different concentrations were analyzed by DPV for the evaluate of the analytical performance of the developed method. Linear responses were observed by studying the increment in the peak currents for the Se(IV) in the concentration range 2-10 ppb (Figure 8).

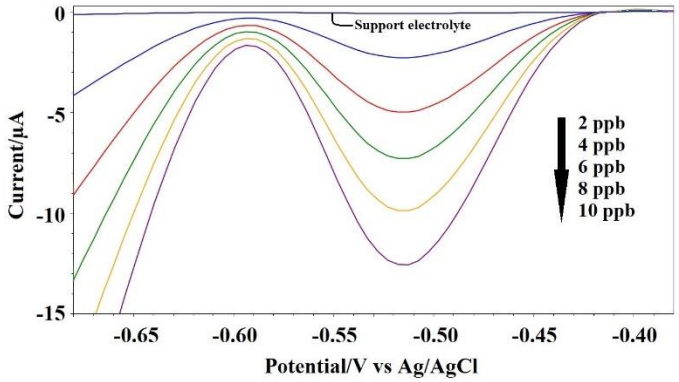



Figure 8. DPVs of Se(IV) at activated Pd electrode in pH 2.0 BR buffer. Scan rate: 75 mV/s

Figure 9 shows that the peak currents and the concentrations a good linearity. The linear regression equations was $i_p$=1.1266C-0.0348 ($R^2$ = 0.9988).

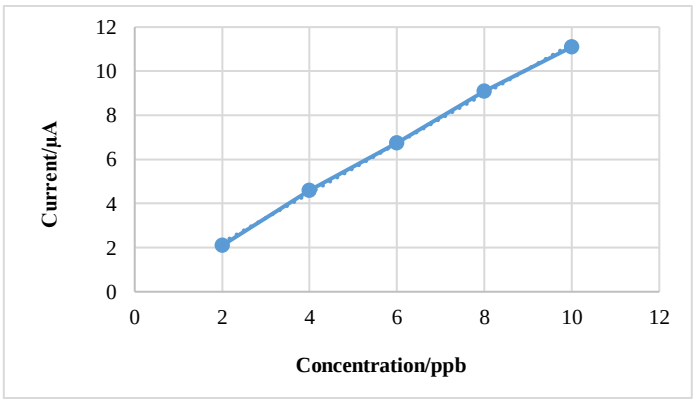



Figure 9. Calibration curve for Se(IV)

The results are shown in Table 2. The acceptable recoveries showed that the successful applicability of the developed method for the determination of Se(IV).

Table 2. Determination of Se(IV) in synthetic sample by DPV.

| Synthetic sample no | Content/ppb | Found/ppb | Recovery % | RSD% |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 5 | 5.07±007 | 101.33 | 1.36 |
| **2** | 7 | 7.14±0.04 | 101.94 | 0.57 |
| **3** | 9 | 9.17±0.07 | 101.84 | 0.74 |

n=5

**Real samples analysis**

The proposed method was applied to the determination of Se(IV) in tap water. The tap water samples were taken from three different regions of Ankara. The results were summarized in Table 3.

Table 3. Determination of Se(IV) in water samples by DPV.

| Tap water | Added/ppb | Found/ppb | Recovery % | RSD% |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 15 | 15.18±007 | 101.20 | 0.85 |
| 2 | 15 | 15.04±0.04 | 100.29 | 1.89 |
| 3 | 15 | 14.88±0.07 | 99.20 | 1.73 |

n=5

The percent recovery was found in the range of 99.20-101.2%. The RSD values were less than 1.89%. In other words, the results prove that the developed method is suitable for the determination of Se(IV) in real samples with high sensitivity and precision.

**Interference studies**

The effect of the foreigner ions on the determination of selenium by the developed method were investigated. The possible interferences of $Sb^{3+}$, $Cu^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Pb^{2+}$, $Al^{3+}$ and $Cr^{3+}$ on the determination of selenium was investigated by addition of the foreign ions at 10 and 250 ppb to a solution containing 25 ppb Se(IV) under the optimized conditions. The peak current and peak morphology of selenium was not affected.

**Conclusion**

In this study, the development of a simple, fast and highly sensitive electrochemical determination method for selenium based on an activated Pd electrode, which was no modification proses, was described. Activated Pd electrode exhibited a good electrocatalytic response for the determination of Se(IV) and a linear range was obtained between 1 and 200 ppb with a LOD of 0.4 ppb. The simple method was used for the measurement of Se(IV) in synthetic and real water samples and acceptable RSD (%) and recovery (%) results were obtained.

**REFERENCES**

Acikkapi AN, Tuzen M, Hazer B 2019. A newly synthesized graft copolymer for magnetic solid phase microextraction of total selenium and its electrothermal atomic absorption spectrometric determination in food and water samples. Food Chemistry, 284: 1–7.

Ashournia M, Aliakbar A 2009. Determination of selenium in natural waters by adsorptive differential pulse cathodic stripping voltammetry. Journal of Hazardous Materials, 168: 542–547.

Barache UB, Shaikh AB, Lokhande TN, Anuse MA, Kamble GS, Gurame VM, Gaikwad SH 2017. Acid switched efficient, cost effective, selective separation and determination of selenium(IV). Journal of Environmental Chemical Engineering, 5: 4828–4840.

Baś B, Jedlińska K, Węgiel K 2014. New electrochemical sensor with the renewable silver annular band working electrode: Fabrication and application for determination of selenium(IV) by cathodic stripping voltammetry. Electrochemistry Communications, 49: 79–82.

Bryce DW, Izquierdo A, de Castro L 1995. Flow-injection anodic stripping voltammetry at a gold electrode for selenium (IV) determination. Analytica Chimica Acta, 308: 96-101.

Idris AO, Mabuba N, Arotiba OA 2015. Electroanalysis of selenium in water on an electrodeposited gold-nanoparticle modified glassy carbon electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry, 758: 7–11.

Jain R, Thakur A, Kumar P, D. P 2018. Au/ZnO nanocomposites decorated ITO electrodes for voltammetric sensing of selenium in water. Electrochimica Acta, 290: 291-302.

Kangalgil M, Yardımcı H 2017. Selenyumun insan sağlığı üzerine etkileri ve diyabetes mellitusla ilişkisi. Bozok Tıp Dergisi, 7(4): 66-71.

Kieliszek M, Błażejak S 2013. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. Nutrition, 29: 713–718.

Kumar BS, Priyadarsini KI 2014. Selenium nutrition: How important is it? Biomedicine & Preventive Nutrition, 4: 333–341.

Luo J, Xu F, Tu J, Wu X, Hou X 2017. Amine-functionalized titanium metal organic framework for photochemical vapor generation for determination of selenium by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Microchemical Journal, 132: 245–250.

Ma Y, Zeng K, Duan T 2019. Fast and clean determination of total selenium in biological materials by an improved oxygen flask combustion method combined with hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Microchemical Journal, 148: 743–747.

Martínez AM, Vázquez S, Lara R, Martínez LD, Pacheco P 2018. Selenium analysis by an integrated microwave digestion-needle trap device with hydride sorption on carbon nanotubes and electrothermal atomic absorption spectrometry determination. Spectrochimica Acta Part B, 140: 22–28.

Mörschbächer AP, Dullius A, Dullius CH, Bandt CR, Kuhn D, Brietzke DT, Kuffel FJM, Etgeton HP, Altmayer T, Gonçalves TE, Oreste EQ, Ribeiro AS, de Souza CFV, Hoehne L 2018. Validation of an analytical method for the quantitative determination of selenium in bacterial biomass by ultraviolet–visible spectrophotometry. Food Chemistry, 255: 182–186.

Pyrzynska K, Sentkowska A 2019. Liquid chromatographic analysis of selenium species in plant materials. Trends in Analytical Chemistry, 111: 128-138.

Segura R, Pizarro J, Díaz K, Placencio A, Godoy F, Pino E, Recio F 2015. Development of electrochemical sensors for the determination ofselenium using gold nanoparticles modified electrodes. Sensors and Actuators B, 220: 263–269.

Ullah H, Liu G, Yousaf B, Ali BU, Abbas Q, Munir MAM, Mian MM 2018. Developmental selenium exposure and health risk in daily foodstuffs: A systematic review and meta-analysis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 149: 291–306.

Wang C, He M, Chen B, Hu B 2018. Polymer monolithic capillary microextraction on-line coupled with ICP-MS for determination of inorganic selenium species in natural waters. Talanta, 188: 736–743.

# Berrak hücreli renal hücre karsinomu hastalarının idrar örneklerinde MDA ve AOPP parametrelerinin incelenmesi

Ezginur Kocakır[1], Şule Koç[1], İlhami Şahin[1], Özgür Doğa Özsoy[1*], Esra Acar[1*], Büşra Yaprak Bayrak,[2] Kerem Teke[3], Önder Kara[3], Meltem Özden Dillioğlugil[1]
[1]Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye.
[2]Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye.
[3]Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye.

*Sorumlu yazar e-mail: doga83@hotmail.com

Renal hücreli karsinom (RHK), erişkinlerde görülen kanserlerin %3'ünü oluşturmakta olup böbreğin en sık görülen kanseridir. Berrak hücreli renal hücre karsinomu (ccRCC) ise, renal hücreli karsinomların en sık görülen alt türüdür. Bu çalışmada, sıklıkla metastaz yapan bir tümöre dönüşen renal hücreli karsinomun ilerlemesinde oksidatif stresin önemli olup olmadığı sorusu ele alınmış ve farklı tümör evreleri ve tümör çaplarına göre gruplandırılan ccRCC hastalarının idrarında oksidatif stresin göstergesi olan MDA ve AOPP parametreleri incelenmiştir. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniği'ne başvuran olgulardan radikal nefrektomi ve parsiyel nefrektomi ameliyatı sonrasında histopatolojik olarak ccRCC teşhişi konan hastaların idrar örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. On iki berrak hücreli böbrek kanseri hastası ile 12 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunun idrar örneklerinde MDA ve AOPP düzeylerini kolorimetrik yöntemle ölçüldü. ccRCC hastalarında idrar MDA ve AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). Histopatolojik verilere göre saptanan ≥ 4cm (n=6) ve ≤ 4cm (n=6) tümör çaplarına sahip hasta alt gruplarının idrar MDA ve AOPP düzeyleri arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p>0,05$). Sonuç olarak bu çalışmada, renal hücreli karsinomlu hastalarda oksidatif stresin arttığı ancak tümör çapı ve evreler (pT1a, pT1b, pT2b ve pT3a) arasında MDA ve AOPP parametrelerinde belirgin şekilde farklılık gözlemlenmemiştir.
**Anahtar Kelimeler:** Oksidatif stres, berrak hücreli tip, AOPP, MDA

**Examination of MDA and AOPP parameters in urine samples of patients with clear cell renal cell carcinoma**

Renal cell carcinoma (RHC) is the most common cancer of the kidney, accounts for 3 % of all cancers seen in adults. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common subtype of renal cell carcinomas. In this study, the question of whether oxidative stress is important in the progression of ccRCC is examined and the parameters of MDA and AOPP, which are indicators of oxidative stress. Urine samples of ccRCC patients are grouped according to different tumor stages and tumor diameters. Urine samples of patients who were admitted to Kocaeli University Faculty of Medicine Urology Outpatient Clinic with a diagnosis of ccRCC after radical nephrectomy and partial nephrectomy surgery were included in the study. MDA and AOPP levels were measured by colorimetric method in urine samples of twelve clear cell kidney cancer patients and 12 healthy individuals. Urine MDA and AOPP levels were significantly higher in ccRCC patients compared to the control group ($p<0.05$). No statistically significant difference was found between urine MDA and AOPP levels of patient subgroups with tumor diameters ≥4 cm (n = 6) and ≤4 cm (n = 6) according to histopathological data ($p> 0.05$). In conclusion, in this study, oxidative stress was increased in patients with renal cell carcinoma. However, no significant difference was observed in MDA and AOPP parameters between tumor diameter and stages (pT1a, pT1b, pT2b and pT3a).
**Keywords:** Oxidative stress, ccRCC, AOPP, MDA

## GİRİŞ

Renal hücreli kanser (RHK), erişkinlerde görülen kanserlerin %3'ünü oluşturmaktadır ve böbreğin en sık görülen kanseridir. Elli ile yetmiş yaş arasında insidansı en yüksektir ve 40 yaşın altında çok nadir olarak görülmektedir. Erkeklerde kadınlara göre daha fazla vaka gözlemlenmekte ve erkek/kadın oranı yaklaşık 1,6'dır. Böbrek tümörlerinin %90'ını RHK oluşturmaktadır (Chow ve ark., 2010, Siegel ve ark., 2013). Ürolojik kanserler arasında prostat ve mesane tümörlerinden sonra üçüncü sıklıkta görülürler. Üriner sistem kaynaklı tümörlere bağlı ölümlerde BHK'ler %40'ın üzerindeki oranı ile mortalitesi en yüksek ürolojik kanserdir. Bu oran prostat ve mesane kanserinde %20'lerdedir (Campbell ve Lane 2011). Berrak hücreli renal hücreli karsinom (BHRHK - konvansiyonel tip) ise, RHK'ların en sık görülen histolojik alt türüdür. Renal hücreli karsinomların yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Renal hücreli karsinom tedavisinde diğer kanserlerde olduğu gibi solid tümör onkolojisinde hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin hızla ilerlediği bir noktaya

gelinmiştir. Bu gelişmelere ek olarak, kanser patogenezisinde sınıflandırmanın moleküler temelleri araştırma konusu olmaktadır ve en önemli sorunlar sınıflandırmada yaşanmaktadır (Shuch ve ark., 2015).
DNA da dahil olmak üzere tüm organik moleküller, çok çeşitli oksijen veya nitroksijen bazlı reaktif türlerin oksidatif hasarına maruz kalmaktadır (Davies ve ark., 2005). Dokuda oksidatif hasar oluşumu ile radikal metabolitlerin artması ve bunların oluşturduğu lipid peroksidasyonu, protein ve DNA oksidasyonunun sonucu olarak hücre membranında bütünlük kaybolur, geçirgenlik artar. Bu hasar sıklıkla lipit peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehit (MDA)'in oluşumuna neden olur ve MDA'nın hücre dışına çıkmasına sebep olur (Valko ve ark., 2007).
İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP'ler) ilk kez Witko-Sarsat ve ark. (1998) tarafından üremik hastaların plazmasında bulunmuştur (Witko-Sarsat ve ark, 1998). Daha sonra böbrek hasarı mekanizmalarını araştıran birçok çalışmanın konusu olmuştur. Reaktif oksijen türleri (ROT), bir tirozin yapısı oluşturmak için doğrudan tirozin amino asidini okside eder. Bu durum protein degredasyonuna ve proteinlerin parçalanmasına neden olur. Çapraz bağlardan oluşan bu ürünler AOPP'lerdir, ancak mekanizması bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamıştır (Šebeková ve ark,2012).
Bu çalışmada, sıklıkla metastaz yapan renal hücreli karsinomun ilerlemesinde oksidatif stresin önemli olup olmadığı sorusu ele alınmış ve farklı tümör evreleri ve tümör çaplarına göre gruplandırılan BHRHK hastalarının idrarında oksidatif stresin göstergesi olan MDA ve AOPP parametreleri incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOD

Bu proje KOÜ GOKAEK 2019/193 kodlu etik kurul onayı almıştır. Çalışmamıza 2019-2020 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına başvuran ve berrak hücreli renal hücreli kanser tanısı alan hastalardan idrar örnekleri toplandı. Aynı zamanda olgulara ait patolojik derece ve evrelerinin belirlenmesi amacı ile Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalının patoloji sonuçları incelenerek alt gruplar oluşturuldu (pT1a, pT1b, pT2b ve pT3a). Tümör çapı ≥4 cm (n = 6) ve ≤4 cm (n = 6) olmak üzere de sonuçlar incelendi. İdrarda kreatinin tayini Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında BECKMAN COULTER DXI-600 otoanalizörü ile ölçüldü. Kanser grubu (n=12) ve sağlıklı kişilerin (n=12) spot idrar örnekleri 3000xg'de 15 dk santrifüj edildi. Deney gününe kadar -80 C'de muhafaza edildi. Malondialdehit miktarının ölçümü Buege'nın lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyonuna dayanan manuel metod ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (Buege ve Aust, 1978). AOPP'nin ölçümü Witko-Sarsat ve ark.'nın metoduna göre yapıldı (Witko-Sarsat ve ark, 1998). MDA ve AOPP konsantrasyonları kreatinine oranlanarak standardize edildi. Bu çalışmanın istatiksel analizi IBM SPSS versiyon 20.0 programı kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmede test seçimi için normal dağılıma uygunluk testi yapıldı. Normal dağılına uymadığı için AOPP ve MDA verilerinin analizi için Mann Whitney U testi ile yapıldı. *p* değeri için anlamlılık 0,05 olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Kontrol grubu yaş ortalaması 44,58+17,83, kanser grubu yaş ortalaması 59,25+15,98'dir. Kontrol grubunun % 41,66 kadın iken % 58,34'ü erkektir. Kanser grubunun %25'ini kadınlar oluştururken %75'i erkektir. Kanser alt gruplarındaki hasta sayısı pT1a=6, pT1b=3, pT2b=1, pT3a=2'dir. Tümör çapı ≤ 4cm'den 6 hasta ve ≥ 4cm'den 6 hasta bulunmaktadır. Tümör çapı ≥ 4cm'den olan hastaların tamamı erkektir ve ileri derece tümör evresi görülmektedir (pT1b, pT2b, pT3a). İdrar MDA ve AOPP konsantrasyonları idrar kreatinin değerine oranlanmıştır. Parametrelerin temel tanımlayıcı istatistik tablosu Tablo 1'de verilmiştir.
Kanser alt gruplarında (pT1a, pT1b, pT2b, pT3a) MDA ve AOPP konsantrasyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.
Spearman korelasyon analizine göre MDA ve AOPP konsantrasyonları arasında pozitif yönde bir korelasyon gözlenmiştir (r=0,533, p=0,007).

**Tablo 1.** Verilerin temel tanımlayıcı istatistik tablosu

| | **MDA ortalama ± ss ortanca (%25-75)** | **AOPP ortalama ± ss ortanca (%25-75)** |
|---|---|---|
| Kontrol grubu (n=12) | 24,90 ± 6,82<br>25,57 (21,06 - 28,57) | 379,64 ± 59,27<br>395,48 (338,51- 413,27) |
| Kanser grubu (n=12) | 53,96 ± 24,90[a]<br>47,38 (36,74 - 68,47) | 491,64 ± 143,13[b]<br>450,06 (412,83 - 554,05) |
| p | **0,017** | **0,039** |
| Tümör çapına göre kanser alt grubu | | |
| ≤ 4cm (n=6) | 58,59±32,83<br>48,09 (37,85 - 84,20) | 501,38 ± 192,07<br>466,08 (338,95 - 634,33) |
| ≥ 4cm (n=6) | 49,33 ± 15,30[c]<br>44,64 (35,48 - 67,48) | 481,89 ± 89,16[d]<br>448,13 (415,83 - 553,98) |
| p | **0,008** | **0,009** |

a,b : Kanser grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.
c,d : ≥ 4cm kanser grubu ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

## TARTIŞMA

Renal hücre karsinomu, her yıl dünya çapında 300.000'e yakın insanı etkilemekte ve yaklaşık 100.000'e yakın ölüme yol açmaktadır (Sato ve ark.,2013, TCGA, 2013). Kansere bağlı ölümün en sık 16. nedeni olduğu bilinmektedir. 2012 yılı itibariyle dünya çapında, erkeklerde en sık görülen 9. kanser (214.000 olgu) ve kadınlarda en sık görülen 14. kanser (124.000 olgu) türüdür (Moch ve ark.,2016, Yörükoğlu ve ark., 2016).
Renal hücre karsinomda tümör evresinin tespiti ile hastalığın yayılım düzeyi belirlenerek klinik davranış ve prognoz öngörülmüş olur. Renal tümörlerde güncel olan, 2010 TNM evreleme sistemidir. Bu sisteme göre böbreğe sınırlı olan tümörler, tümör çapına göre kategorize edilmektedir (Pichler ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada, tümör çapı küçük olan olguların, tümör çapı büyük olan olgulara göre daha erken evrede ve daha düşük nükleer dereceye sahip olduğu saptandı (sırasıyla p=0,001; p=0,007) (Kuzular 2019). Bizim çalışmamızda da hasta sayımız yetersiz olsa da tümör çapı ≥ 4cm olan hastaların tamamı erkekti ve ileri derece tümör evresine sahiplerdi (pT1b, pT2b, pT3a).
Oksidatif stres, RHK dahil olmak üzere çeşitli malignitelerin patogenezinde önemli bir rol oynar. Reaktif oksijen türleri (ROT), karsinojenez sürecini indükleyebilir ve DNA'ya zarar vererek tümörün ilerlemesine sebep olabilir ve malign transformasyon ile ilişkili olan hücresel sinyal yolaklarını doğrudan aktive edebilir (Pavlović ve ark., 2019). Bir çalışmada, böbrek kanseri dokusunda antioksidan enzim ekspresyonunun ve aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Pljesa-Ercegovac ve ark., 2008). Ayrıca, ROT'nin enzimatik kaynağı aşırı aktiftir ve RHK hastalarında oksidatif stresin artmasına neden olur (Block 2012, Ganesamoni ve ark., 2012). Bu bulgulara dayanarak, kalıcı oksidatif stresin RHK'nın karakteristik bir özelliği olduğuna vurgu yapılmaktadır. Pavlović ve ark.'nın yaptığı çalışmada, radikal nefrektomi ile BHRHK'lu hastalardan alınan doku örneklerinde antioksidan enzim aktiviteleri, MDA ve GSH seviyelerinin prognostik açıdan bir önemi olmadığı sonucuna varılmıştır. Fakat Geçit ve ark., serum MDA düzeylerini böbrek kanseri hastalarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulmuştur (p <0,05) (Geçit ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda idrar MDA düzeyleri kontrol grubuna göre kanser grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,017). Ayrıca ≥ 4cm kanser grubu MDA seviyeleri de kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir (p=0,017).
AOPP'ler, serbest radikal ataklarında öncelikle serum albümininden türeyen ürünlerdir ve oksidatif stresin proteinlere doğrudan zarar verebileceğine dair kanıtlar sağlamaktadır. Literatürde azalan böbrek fonksiyonu, AOPP düzeylerindeki artışla ilişkili bulunmuştur ve bu da onları kronik böbrek hastalıklarında iyi belirteçler haline getirmektedir (Sung ve ark., 2013). Biz de bu çalışmamızda RHK'li hastaların idrarında anlamlı derecede AOPP seviyelerini yüksek bulduk (p=0,039). Ayrıca ≥ 4cm kanser grubu AOPP seviyeleri de kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir (p=0,009). Bir çalışmada, meme ve kolorektal kanser hastalarının idrar örneklerinde, özellikle AOPP'nin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Chandramathi ve ark., 2009). AOPP seviyeleri meme kanserinde(135.62 ± 5.80 µmol/L, p < 0.05), kolorektal kanserde (173.06 ± 12.14 µmol/L, p < 0.001) ve diğer tip kanserlerde (166.04 ± 9.06 µmol/L, p < 0.001) kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur (Chandramathi ve ark., 2016).

Genellikle, üriner metabolitler geniş bir zaman dilimi içinde tüm vücuttan atılan hasarlı veya oksitlenmiş ürünlerin iyi bir göstergesi olarak kabul edilir (Shioji 2005). İnvaziv olmayan oksidatif hasar metabolitlerinin kanser sürecinde potansiyel kullanımını değerlendirmek için, oksidatif stres oluşturabilecek diğer hastalık durumlarıyla da karşılaştırma yapılması gerekmektedir.
BHRHK'lı hastalarda oksidatif stresin arttığı görülmüş ancak tümör çapı (≥ 4cm ve ≤ 4cm) ve evreler (pT1a, pT1b, pT2b ve pT3a) arasında MDA ve AOPP parametrelerinde belirgin şekilde farklılık gözlenmemiştir.

**SONUÇ**

Bu çalışmada, serbest radikal hasarı nedeniyle üriner metabolit düzeylerini etkileyebilecek iki ana oksidatif belirteç kullanılarak BHRHK hastaları değerlendirilmiştir. Oksidatif stresin RHK oluşumda önemli olduğu bilindiğinden dolayı hastalardan elde edilen biyolojik materyellerin sonuçlarının karşılaştırılması önemlidir. Böbrek tümörü ve biyobelirteçler arasındaki ilişkiyi anlamak için daha fazla hasta sayısına ve serum, plazma ve doku gibi biyolojik materyallerle yapılan ileri seviye genetik analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

**KAYNAKLAR**

Block K 2012. Oxidative stress and redox-signaling in renal cell cancer. Emerging Research and Treatments in Renal Cell Carcinoma. Amato R (ed.). InTech, Rijeka, 137-66.

Buege JA, Aust SD 1978. Microsomal lipid peroxidation. In Methods in enzymology, 52: 302-310.

Campbell SC, Lane BR 2011. Malignantrenaltumors in Campbell-Walshurology. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Philadelphia: SaundersElsevier; p. 1413-74.

Chandramathi S, Suresh K, Anita ZB, Kuppusamy UR 2009. Comparative assessment of urinary oxidative indices in breast and colorectal cancer patients. Journal of cancer research and clinical oncology, 135(2): 319-323.

Chandramathi S, Suresh K, Anita ZB, Kuppusamy UR 2016. Urinary Advanced Oxidation Protein Product: A Potential Oxidative Damage Marker for Cancer. West Indian Medical Journal, 65(3).

Chow WH, Dong LM, Devesa SS 2010. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. Nat Rev Urol, 7 (5): 245-257.

Davies KJA 2005. The broad spectrum of responses to oxidative stress in proliferating cells. Handbook of Environmental Chemistry 2: 63-75.

Ganesamoni R, Bhattacharyya S, Kumar S, Chauhan A, Mete UK, Agarwal MM, ... Singh SK 2012. Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma. The Journal of urology, 187(4): 1172-1176.

Gecit I, Aslan M, Gunes M, Pirincci N, Esen R, Demir H, Ceylan K 2012. Serum prolidase activity, oxidative stress, and nitric oxide levels in patients with bladder cancer. Journal of cancer research and clinical oncology, 138(5): 739-743.

Kuzular H 2019. Berrak hücreli renal hücreli karsinomlarda hif-1α, hif-2α, pd-1, pd-l1 ekspresyonlarının analizi. [Uzmanlık Tezi]. Pamukkale Üniversitesi; DENİZLİ.

Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE 2016. Tumours of the kidney. In: WHO Classification of Tumours of the urinary system and male genital organs. 4th Edition. Lyon: IARC; p. 11-76.

Pavlović I, Pejić S, Radojević-Škodrić S, Todorović A, Stojiljković V, Gavrilović L, Popović N, Basta-Jovanović G, Džamić Z, Pajović SB 2019. The effect of antioxidant status on overall survival in renal cell carcinoma. Archives of medical science:AMS, 16(1): 94-101.

Pichler M, Hutterer GC, Chromecki TF, Jesche J, Kampel-Kettner K, Groselj-Strele A,... Zigeuner R. 2013. Comparison of the 2002 and 2010 TNM classification systems regarding outcome prediction in clear cell and papillary renal cell carcinoma. Histopathology, 62(2): 237-246.

Pljesa-Ercegovac M, Mimic-Oka J, Dragicevic D, Savic-Radojevic A, Opacic M, Pljesa S, ... Simic T 2008, March. Altered antioxidant capacity in human renal cell carcinoma: role of glutathione associated enzymes. In Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations Vol. 26, No. 2, pp. 175-181.

Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T,... Nagata Y 2013. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. Nature genetics, 45(8): 860.

Shioji I 2005. Oxidative stress related diseases and biopyrrins. Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology, 53(2): 155-159.

Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A,... Kutikov A 2015. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. European urology, 67(1): 85-97.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A 2013. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin, 63 (1): 11-30.

Sung CC, Hsu YC, Chen CC, Lin, YF, Wu CC 2013. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013.

The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) 2013. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. Nature, 499(7456): 43.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology, 39(1): 44-84.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure1, 2. J. Immunol. 161(5): 2524-32.

Yörükoğlu K, Tuna B 2016. Üropatoloji. İzmir: Kongre Kitabevi, 1-167.

# Kabak çekirdeği yağı yüklü PEG-PCL misellerinin meme kanseri ve glioma hücreleri üzerine etkisinin incelenmesi

Nermin Saliha Topuzoğulları[1], Murat Topuzoğulları[2], Banu Mansuroğlu[1]*

*[1]Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye.
[2]Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalürji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye.

*Sorumlu yazar e-mail: bmansur@yildiz.edu.tr

## Özet

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünya çapında en çok ölüme sebep olan ikinci hastalıktır. Cerrahi yöntemler ve radyoterapi, kanser tedavisi için en etkili tedavi yöntemlerindendir, ancak kanser metastaz yaptığı zaman yetersizdir. Kemoterapötik ilaçlar ise, kanser hücrelerinin hızlı çoğalmasını engelleseler de sağlıklı hücreleri de etkilemektedirler. Bu sebeple doğal bileşiklerin antikanser etkinliklerinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

Kabak çekirdeği yağının prostat, meme, kolon, akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerinde hücre proliferasyonunu engellediği yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada, kabak çekirdeği yağı taşıyıcı sistemler içerisine enkapsüle edilerek ilgili dokulara hedeflenmesi ve antikanser etkinliğinin arttırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, öncelikle, Cucurbitaceae ailesinin bir üyesi olan *Cucurbita moschata* (bal kabağı) çekirdek yağı PCL-PEG (polikaprolakton-b-polietilenglikol) kopolimerlerine enkapsüle edilerek nanotaşıyıcı sistemler üretilmiştir. Üretilen nanotaşıyıcılar dinamik ve elektroforetik ışık saçılması ile incelenerek hidrodinamik boyutları ve zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Ayrıca nanotaşıyıcı yüzeyine yağ moleküllerinin tutunması FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Yağ ve yağ yüklü nanotaşıyıcılar, glioma (C-6) ve MCF-7 hücre hatları üzerinde incelenerek antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] yöntemi ile kabak çekirdeği yağının ve bu yağ ile yüklü nanotaşıyıcıların hücre proliferasyonuna ve yara iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiş ve yağ yüklü nanotaşıyıcıların serbest yağa göre daha yüksek aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** kabak çekirdeği yağı, polietilen glikol, polikaprolakton, kanser

# Investigation of the effects of PEG-PCL micelles loaded with pumpkin seed oil on breast cancer and glioma cells

## Abstract

Cancer is the second most fatal disease worldwide after cardiovascular disease. Surgical operation and radiotherapy are the most effective cancer treatments, but insufficient for metastatic cancers. Chemotherapeutic drugs, on the other hand, prevent cancer cells from proliferating, but also affect healthy cells. For this reason, it is of great importance to examine the anticancer activities of natural compounds.

There are studies that pumpkin seed oil prevents cell proliferation in some types of cancer such as prostate, breast, colon and lung cancer. In this study, it is aimed to target the related tissues and increase the anticancer effectiveness of pumpkin seed oil by encapsulating into carrier systems. In this context, primarily, nanocarrier systems were produced by encapsulating *Cucurbita moschata* (pumpkin) seed oil, which is a member of the Cucurbitaceae family, into PCL-PEG (polycaprolactone-b-polyethylene glycol) copolymers. The nanocarriers produced were examined by dynamic and electrophoretic light scattering, and their hydrodynamic dimensions and zeta potentials were determined. In addition, the adsorption of the oil molecules onto the nanocarrier surface was examined by FTIR spectroscopy. Anticancer activities were investigated by examining the oil and oil-loaded nanocarriers on glioma (C-6) and MCF-7 cell lines. With MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide] method, the effects of pumpkin seed oil and nanocarriers loaded with oil on cell proliferation and wound healing were examined and it was determined that the oil-loaded nanocarriers exhibited higher activity compared to the oil.

**Keywords:** pumpkin seed oil, polyethylene glycol, polycaprolactone, cancer

# GİRİŞ

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünya çapında en çok ölüme sebep olan ikinci hastalıktır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Cerrahi yöntemler ve radyoterapi, kanser tedavisi için en etkili tedavi yöntemlerindendir, ancak kanser metastaz yaptığı zaman yetersizdir. Metastatik kanserler için öncelikli tedavi yöntemi olan kemoterapide kanser hücrelerinin hızlı çoğalması engellense de kullanılan antikanser ilaçları sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir (Chabner ve Roberts, 2005). Bu sebeple, yan etkilerinin daha düşük olacağı düşünülen doğal bileşiklerin kemoterapide kullanılmak üzere antikanser etkinliklerinin incelenmesi önemli bir alan haline gelmiştir.

Doğal bileşiklerden oluşan bir karışım olan kabak çekirdeği yağı; prostat, meme, kolon, akciğer kanseri gibi kanser türlerinde hücre proliferasyonunu engellediği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Mitra vd., 2009, Al-Okbi vd., 2016, Medjakovic vd., 2016). Kabak çekirdeği yağı steroller, tokoferoller ve fosfolipidler gibi aktif maddeler olan yağ ve yağ asitlerini içermektedir (Petkova ve Antova, 2015). Ancak bu karışım suda çözünmeyen moleküllerden oluştuğu için bir taşıyıcı kullanılarak hedef doku ve hücrelere ulaştırılması gerekmektedir. Bu kapsamda nanotaşıyıcı sistemlerin önemli avantajları bulunmaktadır. Nanotaşıyıcılar kanser ilaçlarının kontrollü salımı, yan etkilerin azaltılması ve suda çözünürlüğünü arttırılması gibi çok önemli iki etki sebebiyle tercih edilmektedir (Tüylek, 2017). Nanotaşıyıcılar ile gerçekleştirilen hedefli tedavilerin, tümörlerin büyümesi ve ilerlemesinde rol oynayan spesifik biyolojik transdüksiyon yolaklarını veya kanser proteinlerini bloke edebildikleri de literatürde gösterilmiştir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015).

Nanotaşıyıcı sistemlerden biri olan polimerik miseller, amfifilik blok kopolimerlerin bir araya gelmesiyle oluşan hidrofilik bir kabuğa ve hidrofobik bir çekirdeğe sahip nanoboyutlarda küreselleşmiş yapılardır (Torchilin, 2007). Polimerik miseller, ilaçların suda çözünürlüğünü arttırmakta, yüksek miktarda ilaç taşıyabilmekte, nano boyutta (20-80 nm) üretilebilmekte, taşıdıklarını kargo molekülü immün sistemden koruyabilmektedir (Kwon ve Kataoka, 2012). Polimerik misellerin bu özellikleri; kanda uzun süre sirküle olmalarını, EPR (arttırılmış geçirgenlik ve alıkonma) etkisiyle kanserli dokulara pasif hedeflenmelerini ve ilaç moleküllerinin olumsuz yan etkilerini azaltabilmelerini sağlamaktadır (Torchilin, 2011).

İlaç salımı sistemi olarak kullanılan polimerik misellerin oluşumunda sıkça kullanılan polimerlerden birisi poli(ε-kaprolakton)-*b*-poli(etilenglikol) (PCL-*b*-PEG) kopolimeridir (Sun vd., 2011). Her iki bloğu da biyouyumlu olan bu polimerin hidrofobik PCL bloğu miselin çekirdeğini oluştururken, hidrofilik PEG bloğu ise miselin suyla etkileşen dış kabuğunu oluşturmaktadır. PCL, biyobozunur ve kolay şekillenebilir bir polimerdir ve cerrahi ipliklerden kontrollü ilaç salım sistemlerine dek birçok alanda uygulanmaktadır (Özsağıroğlu, 2011). Miselin yüzeyinde bulunacak olan PEG zincirleri, yoğun bir hidrofilik bariyer oluşturulmasını, sirkülasyon süresinin artmasını, retiküler endotelyal sistem (RES) ile etkileşimlerin azalmasını, ilaç salım sistemlerinin hidrodinamik boyutunun artırılarak vücuttan atılmasının azaltılmasını sağlanmaktadır (Pasut vd., 2015).

Bu çalışmada, kansere karşı etkinliği olduğu bilinen kabak çekirdeği yağının taşıyıcı polimerik miselleri içerisine enkapsüle edilmesiyle bu doğal yağın kanserli dokulara pasif olarak hedeflenebileceği ve antikanser etkinliğinin arttırılabileceği öngörülmüştür. Bu kapsamda, öncelikle, Cucurbitaceae ailesinin bir üyesi olan *Cucurbita moschata* (bal kabağı) çekirdek yağının PCL-b-PEG kopolimerlerine enkapsüle edilerek nanotaşıyıcı sistemlerin üretilmiş, FTIR spektroskopisi ve ışık saçılması spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Üretilen bal kabağı çekirdek yağı yüklü nanotaşıyıcıların, glioma (C-6) ve MCF-7 hücre hatları üzerinde MTT ve yara iyileşmesi yöntemleri ile incelenerek antikanser aktiviteleri araştırılmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyaller

ε-Kaprolakton (CL), metoksi-PEG (Mw = 5 kDa, mPEG) ve kalay(II) 2-etikhekzanoat (SnOct2) Sigma-Aldrich'ten edinilmiştir. Diklorometan (DCM) ve dietil eter Merck'ten satın alınmıştır. Kabak çekirdeği yağı (Bilge Aktar Evlüceler, soğuk sıkım), diyaliz membranı (MWCO: 12 kDa, Sigma) ve aseton (Merck) misel üretiminde kullanılmıştır. NaCl, $NaH_2PO_4$, $Na_2HPO_4$, NaOH ve HCl Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Dulbecco's modified Eagle Medium (Sigma), F12 besi karışımı (Ham-Gibco), penisilin-streptomisin (Sigma), L-glutamin (Gibco), fetal sığır serumu (Gibco), tripsin-EDTA (Multicell) hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanmasında kullanılmıştır. Hücre sayısının belirlenmesinde ise tripan mavisi (Sigma) boyası kullanılmıştır. Hücre canlılığı testi için 3–(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromür (MTT, Sigma), dimetil sülfoksit (DMSO, ChemCruz) kullanılmıştır. C6 sıçan glioma hücreler ve MCF-7 insan meme kanseri hücreleri "American Type Culture Collection"dan (ATCC, Manassas,VA) elde edilmiştir.

### PCL-*b*-PEG Diblok Kopolimer Sentezi

PCL-b-PEG diblok kopolimerinin sentezinde mPEG:CL mol oranı 1:100 olarak alınmıştır. Katalizör olarak toplam mol sayısının % 1,5'i kadar (SnOct2) kullanılmıştır. Sentez sırasında Milestone MicroSYNTH mikrodalga sentez cihazı kullanılmıştır. mPEG, CL ve SnOct2 reaksiyon tübüne konduktan sonra karışımdan yaklaşık 20 dakika azot gazı geçirilmiştir. 300 W mikrodalga enerjisi verilerek 100 °C'de 30 dakika boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Karagöz ve Dinçer, 2010). Reaksiyon karışımı soğurken DCM eklenerek homojen bir çözelti hazırlanmış ve ardından bu çözeltiye aşırı miktarda soğuk dietil eter eklenerek polimer çöktürülmüştür. Polimer tekrar DCM'de çözüldükten sonra soğuk dietil eterle çöktürülmüştür. Bu işlemen az 3 sefer tekrarlandıktan sonra çöken polimer vakum etüvde kurutulmuştur. Elde edilen beyaz renkli toz polimer jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir.

### PCL-*b*-PEG Diblok Kopolimerinden Misel Üretimi

24 mg PCL-*b*-PEG kopolimerinin 10 mL asetonda çözülmesiyle elde edilen çözelti karışmakta olan 20 mL distile suya damla damla eklenmiştir. Tüm polimer çözeltisi suya eklendikten sonra, 4 saat boyunca karıştırmaya devam edilerek aseton uzaklaştırılmış ve ardından 12 saat boyunca suya karşı diyaliz yapılmıştır. Elde edilen örnek ışık saçılması spektroskopisi ve FTIR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir.

### Kabak Çekirdeği Yağı Yüklü PCL-*b*-PEG Misellerinin Üretimi

10 mL asetonda 24 mg PEG-PCL kopolimerinin çözünmesiyle hazırlanan çözeltiye kabak çekirdeği yağı eklenerek karıştırılmıştır. Homojen hale gelen polimer ve yağ çözeltisi karışmakta olan 20 mL distile suya damla damla eklenmiştir. Asetonu uzaklaştırmak üzere çözelti 4 saat daha karıştırılmıştır. Ardından bu çözelti 12 saat suya karşı diyaliz edilmiştir. Yağ yüklü miseller hazırlanırken 24 mg polimer sabit tutularak 40, 80, 120 ve 160 mg yağ eklenerek farklı miktarlarda içeren 4 farklı misel çözeltisi hazırlanmıştır.

### PEG-PCL Misel ve Kabak Çekirdeği Yağı Yüklü PEG-PCL Misel Karakterizasyonu

Karakterizasyon için FTIR spektroskopisi (Shimadzu IRPrestige-21) ile kimyasal yapı değerlendirmesi yapılmış, ışık saçılması spektroskopisi (Malvern Zetasizer Nano ZS) ile de misel boyutlarına, çoklu dağılım indeksine (PDI) ve zeta potansiyeline bakılmıştır.

### Hücre Canlılığı Testi

Üretilen misellerin hücre canlılığı üzerine etkisi C6 ve MCF7 hücreleri üzerinde MTT (3–(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromür) testi yapılarak incelenmiştir.

$1x10^4$ C6 glioma hücresi 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. İnkübasyondan sonra mevcut besiyeri değiştirilerek yerine farklı konsantrasyonlarda yağ ve yağ yüklü miselleri içeren besiyeri eklenmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri, son konsantrasyonu 50 mg/mL MTT olacak şekilde medyumla değiştirilmiştir ve 37 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Oluşan formazan kristalleri 0,1 mL DMSO eklenerek çözülmüş ve mikroplaka okuyucuda 570 nm'de ölçülmüştür. İşlem yapılmayan hücrelerin bulunduğu kuyucuklar kontrol hücreleri olarak kullanılmıştır. Her bir örnek için en az 3 çalışma yapılmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Test sonucu olarak $IC_{50}$ değerleri belirlenmiştir. $IC_{50}$, C6 glioma hücrelerinin %50'sinin canlılık gösterebildiği yağ konsantrasyonudur. Hücre canlılığı ise (1) numaralı formül kullanılarak hesaplanmıştır. (1) numaralı formülde, OD değeri hücre çözeltisinin 570 nm'deki absorpsiyon değeridir.

$$Hücre\ canlılığı\ (\%) = \frac{OD_{işlem\ görmüş\ hücreler}}{OD_{işlem\ görmemiş\ hücreler}}\ x\ 100 \qquad (1)$$

MCF-7 hücreleri için de aynı işlemler gerçekleştirilerek yağ ve yağ yüklü misellerin bu hücrelerin canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir.

MTT testinde hem tek başına yağ hem de yağ yüklü misel örneklerinde eşdeğer miktarda yağ olacak şekilde yağ konsantrasyonalrı belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar kullanılan yağ konsantrasyonu üzerinden verilmiştir.

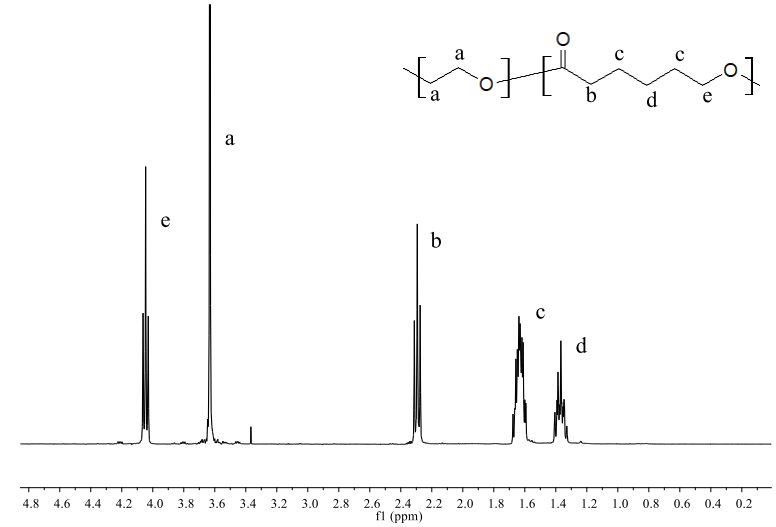
### Yara İyileşmesi (Hücre Göçü) Testi

24 kuyucuklu mikroplakalarda her kuyucukta $7x10^5$ C6 glioma hücresi olacak şekilde ekilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında besiyeri değişimi olmadan hücrelerin arasında boşluk oluşturulacak şekilde pipet ucunu kuyucuğun tabanına bastırarak bir çizgi çekilmiştir. Yüzeye tutunmayan hücreler yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra yağ ve yağ yüklü miselleri içeren yeni besiyerleri hücreler üzerine eklenmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında mikroskop görüntüleri alınmış ve çiziklerin iki tarafındaki hücreler arasındaki mesafe ölçülmüştür. Her bir örnek için 3 tekrar yapılmıştır.

Aynı test MCF-7 hücreler için de tekrarlanmış ve yağ ile yağ yüklü misellerin bu hücrelerin göçü üzerindeki etkisi de incelenmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada kabak çekirdeği yağı yüklü PCL-b-PEG kopolimer misellerinin üretimi ve bu misellerin kanser hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle PCL-b-PEG kopolimeri sentezlenmiştir. mPEG polimerinin hidroksil grubunun bulunduğu zincir ucundan ε-kaprolaktonun (CL) halka açılması polimerizasyonuyla kopolimer sentezlenmiştir. Şekil 1'de sentezlenen kopolimere ait $^1$H-NMR spektrumu verilmektedir. Spektrumda mPEG'e ait -$CH_2$- protonları 3,6 ppm'de gözlenirken, PCL bloğundaki -$CH_2$- protonlarına ait pikler ise sırasıyla 4,0; 2,3; 1,6 ve 1,4 ppm'de gözlenmiştir. Kopolimer GPC ile analiz edildiğinde ise Mw değeri 25 kDa olarak belirlenmiş ve tek pik olarak elüe olmuştur. Polimerizasyonda kullanılan mPEG polimerinin Mw değerinin 5 kDa olduğu bilindiğinden PCL bloğunun Mw değeri yaklaşık 20 kDa'dır. Elde edilen bu sonuçlar PCL-b-PEG diblok kopolimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.




Şekil 1. Sentezlenen PCL-b-PEG blok kopolimerine ait $^1$H-NMR spektrumu.

Çalışmanın sonraki aşamasında çekirdek kısmında kabak çekirdeği yağı yüklü PCL-b-PEG kopolimer misellerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle sadece PCL-b-PEG kopolimerinden oluşan bir misel üretilmiştir. Sonrasında ise, misel oluşumu sırasında farklı konsantrasyonlarda kabak çekirdeği yağı eklenerek kabak çekirdeği yağı yüklü PCL-b-PEG miselleri oluşturulmuştur. Üretilen miseller ilk olarak dinamik ve elektroforetik ışık saçılması spektroskopisi ile incelenerek misellerin boyutları, boyut dağılımları ve zeta potansiyelleri bulunmuştur. Tablo 1'de ışık saçılması spektroskopisinden elde edilen veriler sunulmaktadır.

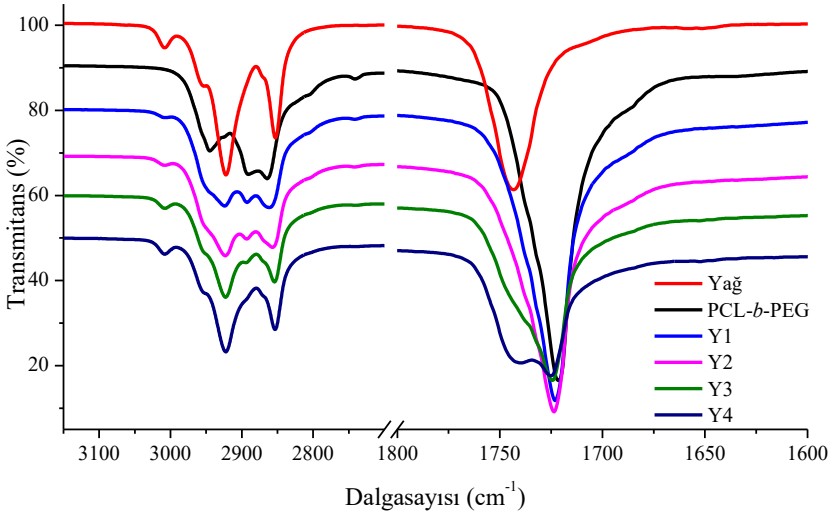
Tablo 1. Üretilen misellerin içerikleri ve bu misellerin ışık saçılması spektroskopisinden elde edilen hidrodinamik çap, çoklu dağılımı indisi (PDI) ve zeta potansiyel değerleri

| Misel Adı | PCL-b-PEG Konsantrasyonu (mg/mL) | Yağ Konsantrasyonu (mg/mL) | z-Ortalama Hidrodinamik Çap (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|---|---|---|---|---|---|
| B1 | 1,2 | 0 | 65,4 | 0,114 | -16,10 |
| Y1 | 1,2 | 2 | 116,5 | 0,073 | -18,40 |
| Y2 | 1,2 | 4 | 141,2 | 0,062 | -16,00 |
| Y3 | 1,2 | 6 | 161,2 | 0,065 | -20,40 |
| Y4 | 1,2 | 8 | 172,7 | 0,076 | -21,10 |

Tablo 1'de görüldüğü üzere sadece polimerden oluşan miselin boyutu en küçük değere, 65,4 nm'ye, sahiptir. Yağ eklenmesiyle oluşan miselin çapının arttığı ve eklenen yağ miktarının artmasıyla beraber misel çapının da doğru orantılı arttığı net bir şekilde görülmektedir. Bu durum yağ moleküllerinin oluşan misel içerisinde enkapsüle edildiğini göstermektedir. Oluşan tüm misellerin PDI değerlerinin 0,1'e yakın veya daha düşük olduğu saptanmıştır ve bu değerler oluşan misellerin monodispers özellikte olduğunu göstermektedir. Üretilen misellerin hidrodinamik çaplarının 200 nm'den küçük olması pasif hedefleme için uygun olduklarını ve monodispers özellikte olmaları da yapı-fonksiyon ilişkisi kurulabilmesine imkan verebileceklerini göstermektedir.

Çalışmanın sonraki aşamasında enkapsülasyon etkinliği ve yükleme verimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak, oluşan misellerin santrifüjle çöktürülememesi ve yağ moleküllerinin diyaliz membranından dışarı difüz olmamasından dolayı doğrudan ya da dolaylı olarak misel içerisine yüklenen yağ miktarları saptanamamıştır. Bu sebeple tüm yağ moleküllerinin oluşan miseller tarafından enkapsüle edildiği kabul edilmiştir. Ancak, yağ moleküllerinin misellerin iç kısmına yüklendiğinin anlaşılabilmesi için FTIR spektrometresi kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle üretilen tüm yağ yüklü miseller liyofil olarak kurutulmuş ve daha sonra FTIR spektrumları alınmıştır. Şekil 2'de yağ, PCL-b-PEG kopolimeri ve yağ yüklü PCL-b-PEG misellerin FTIR spektrumları verilmektedir.

Yağ, kopolimer ve misellerin FTIR spektrumları incelendiğinde özellikle 2800-3050 ile 1700-1800 $cm^{-1}$ aralığındaki bantlarda farklılıkların olduğu saptanmıştır. Şekil 2'de yağ ve kopolimere ait spektrumlar karşılaştırıldığında 3007 $cm^{-1}$'de yağ spektrumunda görülen C=C bandının kopolimerde böyle bir grup olmadığı kopolimerin spektrumunda bulunmadığı görülmektedir. Ayrıca yağ ve kopolimerde bulunan C=O gruplarına ait bantların farklı dalgasayılarında bant verdikleri görülmektedir. Yağa ait C=O grubu 1745 $cm^{-1}$'de bant verirken kopolimere ait C=O grubu 1720 $cm^{-1}$'de bant vermektedir. Yağ yüklü misellerin spektrumları incelendiğinde ise en düşük yağ miktarına sahip olan Y1 kodlu miselde 3007 $cm^{-1}$'de belirgin olmayan bir bant gözlenirken C=O grubuna ait bant kopolimerle yaklaşık aynı dalgasayısında bant vermiştir. Ancak misel çözeltisinde bulunan yağ miktarı arttıkça Y2, Y3 ve Y4 kodlu misellerde 3007 $cm^{-1}$'deki bandın belirginleştiği ve C=O grubuna ait bandın dalgasayısının yağ miktarı arttıkça 1745 $cm^{-1}$'e yaklaştığı veya 1745 $cm^{-1}$'de omuz şeklinde bir bant verdiği görülmektedir. Bu sebeple özellikle Y2, Y3 ve Y4 kodlu misellerde kabak çekirdeği yağı moleküllerinin tamamen miselin iç kısmında (misel çekirdeğinde) enkapsüle olmadığı, bir kısım yağın misel yüzeyinde veya misele yüklenmeden çözelti içerisinde bulunduğu anlaşılmıştır. Bu sebeple, çalışmanın sonraki basamaklarında PCL-*b*-PEG miselleri içerisine enkapsüle edilmiş kabak çekirdeği yağının hücreler üzerindeki etkisin incelemek üzere sadece Y1 kodlu misel incelenmiş ve bu örnekte yağ moleküllerinin tamamının misel çekirdeğinde bulunduğu kabul edilmiştir.




Şekil 2. Kabak çekirdeği yağı, PCL-b-PEG blok kopolimeri ve yağ yüklü PCL-b-PEG misellerine ait FTIR spektrumları

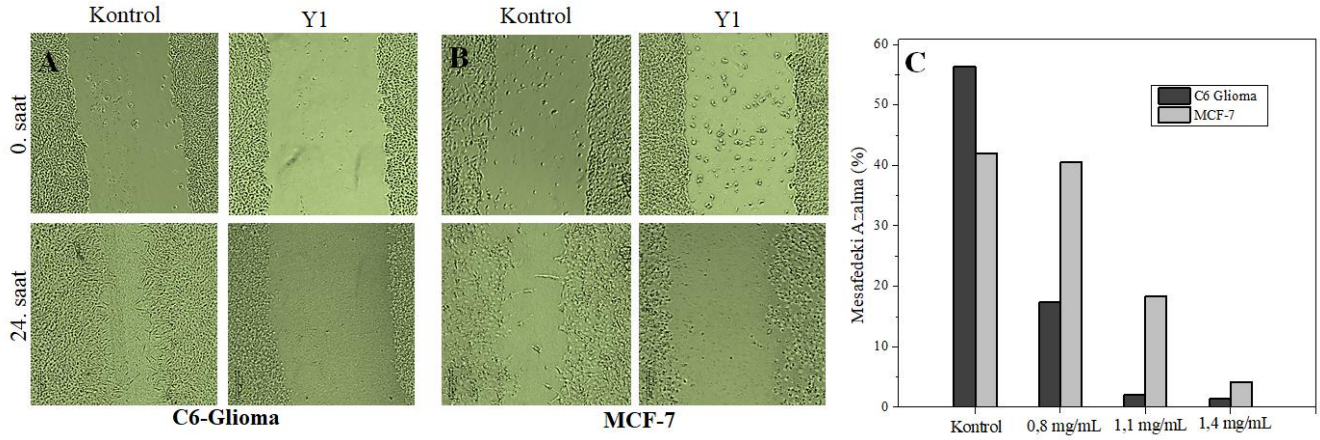
Üretilen misellerin karakterizasyonları tamamlandıktan sonra Y1 kodlu kabak çekirdeği yağı yüklü miselin ve kabak çekirdeği yağının glioma (C-6) ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerinde hücre proliferasyonu üzerine etkileri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Bu amaçla yapılan MTT testlerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen $IC_{50}$ değerleri Tablo 2'de verilmektedir. 24 saat inkübasyon sonrasında değerler incelendiğinde sadece yağın çalışılan konsantrasyon aralığında gliomaya karşı bir etkinlik göstermediği, ancak MCF-7'ye karşı bir inhibisyon etkisi göstermektedir. İnkübasyon süre 48 saate arttırıldığında ise kabak çekirdeği yağının hem glioma hem de MCF-7 ye karşı inhibisyon etkinliği gösterdiği görülmektedir. Y1 kodlu kabak çekirdeği yağı yüklü misel ise hem glioma hem de MCF-7'ye karşı çok daha düşük $IC_{50}$ değerleri verdiği, yani yağ misel içine enkapsüle edildiğinde kanser hücrelerinin proliferasyonunu çok daha düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği çok net anlaşılmaktadır. Sadece kabak çekirdeği yağının kanser hücreleri üzerinde etkinliklerinin daha düşük olmasının; yağların besiyerindeki çözünürlüğünün düşük olması, yağ moleküllerinin bir araya toplanma eğiliminde olması ve sudan daha düşük yoğunlukta olmaları sebebiyle hücre ile etkileşimlerinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, kabak çekirdeği yağı misel içerisine enkapsüle edildiğinde, besiyeri içerisinde çözünürlüğünün ve hücrelerle etkileşiminin arttığı ve bu sebeple de hücre proliferasyonunu daha düşük konsantrasyonlarda bile inhibe ettiği düşünülmektedir.

Tablo 2. Kabak çekirdeği yağı ve yağ yüklü Y1 kodlu miselin C6 glioma ve MCF-7 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen MTT testlerinden elde edilen $IC_{50}$ değerleri

| **Hücre Hattı** | **İnkübasyon Süresi (sa)** | **Kabak Çekirdeği Yağı için $IC_{50}$ (mg/mL)** | **Miselde Enkapsüle Yağ için $IC_{50}$ (mg/mL)** |
|---|---|---|---|
| C6 Glioma | 24 | - | 0,9 |
| | 48 | 36,4 | 1,4 |
| MCF-7 | 24 | 64,6 | 2,0 |
| | 48 | 42,0 | 1,1 |

Misel içerisine enkapsüle edilmiş kabak çekirdeği yağının kanser hücreleri üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için çalışmanın sonraki aşamasında yara iyileşmesi (hücre göçü) testi yapılmıştır. Bu amaçla Y1 kodlu yağ yüklü misel besiyerine değişen miktarlarda eklenerek belli bir mesafeyle ayrılmış hücrelerin göç ederek bir araya gelmeleri üzerinde etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, yine C6 glioma ve MCF-7 hücreleri kullanılarak 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin birbirlerine yaklaştıkları mesafeler ölçülmüştür. Şekil 3A ve 3 B'de başlangıç anında ve 24 saat inkübasyon sonrasında C6 glioma ile MCF-7 hücreleri arasındaki mesafeler değişimi görülmektedir. Besiyerinde 1,4 mg/mL yağ olacak şekilde Y1 miseli eklendiğinde hücrelerin kontrole göre birbirlerine yaklaşmalarının daha az olduğu yani daha az göç ettikleri görülmektedir. Her iki hücre tipinde de hücre göçünün kontrole göre daha az olduğu açıktır.

Besiyeri farklı konsantrasyonlarda yağ içerecek şekilde Y1 miseli eklendiğinde 24 saat inkübasyon sonrasında artan yağ miktarıyla beraber hücreler arasındaki mesafenin daha az miktarda azaldığı Şekil 3C'de gösterilmektedir. Her iki hücre tipinde de yağ yüklü misellerin hücre göçünü inhibe ettiği anlaşılmaktadır. Ancak, aynı yağ konsantrasyonları esas alındığında yağ yüklü miselin C6 glioma hücrelerinin göçünü daha etkili olarak inhibe ettiği görülmektedir.




Şekil 3. 1,4 mg/mL kabak çekirdeği yağ içeren Y1 kodlu miselin C6 glioma (A) ve MCF-7 (B) hücrelerinde hücre göçü testi öncesi ve 24 saat inkübasyon sonrasında elde edilen mikroskop görüntüleri. (C) Y1 misel çözeltisi içinde bulunan kabak çekirdeği yağı konsantrasyonunun hücreler arasındaki mesafenin 24 saat inkübasyon sonrasında azalmasına etkisi.

## SONUÇ

Çalışmada başarılı bir şekilde kabak çekirdeği yağı PCL-b-PEG blok kopolimer misellerine enkapsüle edilmiştir. Işık saçılması spektroskopisi 200 nm'den küçük ve monodispers partiküller üretildiği gösterilmiştir. Üretilen bu nanoboyutlu partiküllerin MCF-7 ve C6 glioma kanser hücrelerinin hem proliferasyonunu hem de hücre göçünü etkili olarak inhibe edildiği gösterilmiştir. Yağ moleküllerinin misel içine enkapsüle dolduğunda antikanser etkinliklerinin daha yüksek olması, misellerin yağ moleküllerinin su içerisinde çözünmesini arttırarak hücre ile daha fazla etkileşime girmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kabak çekirdeği yüklü misellerin iki farklı kanser hücresi üzerinde inhibe edici etkinlik göstermesi, kullanılan polimerin biyouyumlu ve biyobozunur olması, aktivite gösteren kabak çekirdeği yağının doğal kaynaklardan elde edilmiş olması ve üretilen misellerin nanoboyutlu olmasından dolayı pasif hedeflemeyle ilgili dokulara hedeflenebilmesi bu misellerin kanser tedavisinde kullanılmak üzere önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın yazarları hücre kültür çalışmalarındaki desteğinden dolayı Gülşah AKBAŞ'a teşekkür etmektedirler.

## KAYNAKLAR

Al-Okbi S, Mohamed D, Kandil E, Ahmed E, Mohammed S 2016. Antioxidant and anti-cancer effect of Egyptian and European pumpkin seed oil. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences,

Chabner BA, Roberts TG 2005. Chemotherapy and the war on cancer. Nature Reviews Cancer, 5(1): 65-72.

Karagöz A, Dinçer S 2010. Microwave-Assisted Synthesis of Poly(ε-caprolactone)-block-poly(ethylene glycol) and Poly(lactide)-block-poly(ethylene glycol). Macromolecular Symposia, 295(1): 131-137.

Kwon GS, Kataoka K 2012. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. Advanced drug delivery reviews, 64(237-245.

Medjakovic S, Hobiger S, Ardjomand-Woelkart K, Bucar F, Jungbauer A 2016. Pumpkin seed extract: Cell growth inhibition of hyperplastic and cancer cells, independent of steroid hormone receptors. Fitoterapia, 110(150-156.

Mitra P, Ramaswamy HS, Chang KS 2009. Pumpkin (Cucurbita maxima) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil. Journal of food engineering, 95(1): 208-213.

Özsağıroğlu E (2011). Enzimatik polimerizasyon ile sentezlenen polikaprolaktona reaksiyon koşullarının etkisinin ve polikaprolaktonun biyobozunurluğunun incelenmesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Pasut G, Paolino D, Celia C, Mero A, Joseph AS, Wolfram J, Cosco D, Schiavon O, Shen H, Fresta M 2015. Polyethylene glycol (PEG)-dendron phospholipids as innovative constructs for the preparation of super stealth liposomes for anticancer therapy. Journal of controlled release, 199(106-113.

Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 93(52-79.

Petkova ZY, Antova G 2015. Changes in the composition of pumpkin seeds (Cucurbita moschata) during development and maturation. Grasas y aceites, 66(1): 058.

Sun X-m, Xu J-x, Tang J-b, Sui M-h, Shen Y-q 2011. Folate-targeted optical and magnetic resonance dualmodality PCL-b-PEG micelles for tumor imaging. Chinese Journal of Polymer Science, 29(4): 427.

Torchilin V 2011. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. Advanced Drug Delivery Reviews, 63(3): 131-135.

Torchilin VP 2007. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. Pharmaceutical research, 24(1): 1.

Tüylek Z 2017. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim, Drug Delivery Systems and Nanotechnological Interaction. Bozok Tıp Dergisi, 7(3): 89-98.

# Phytotherapy

Migane Nimaan[1], Mehmet Sezgin[1]

*[1]Çankırı Karatekin University, Faculty of Science, Biology Dept., Çankırı, Türkiye

*Corresponding author e-mail: migane_mirane@outlook.fr

**Abstract**

In this study, the development of herbal medicines and the main components of medicinal plants were studied throughout history. Information is given about the chemical structure of some plants and the pharmaceutical properties of the components they contain. Plant medicine is used in everyday diseases, the respiratory, the digestive, disorders of the nervous and urinary, geriatrics, liver diseases, viral diseases, oncology and the immune systems. Herbal remedies have been gaining popularity in the world in recent years. Thirst for balance, return to nature and its incredibly varied pharmacy. It seems that herbal teas, capsules, essential oils and flower essences have never been so successful. Herbal remedies are formed by a complex of molecules derived from one or more plant species. For this reason, herbal medicine is making brilliant progress with the cooperation of modern production, analytical techniques and all disciplines. It is an alternative and complementary solution to classical medicine treatments. Undeniable advantages and a natural impact on our health have led to the daily consumption of medicinal plants. The origin of herbal medicine goes back hundreds of years. Secondary metabolites present in the plants are predominantly responsible for treating various diseases. The most important secondary metabolites include terpenoids, phenolics, flavonoids, alkaloids and glycosides which act as an important source for single bioactive ingredients in nutraceuticals and modern medicines. The areas of activity of metabolites in humans are very diverse: the antibacterial, antiviral, analgesic and anti-inflammatory effects are the most important. Secondary metabolites are not the only components with medicinal properties. Other components have pharmaceutical effects, such as plant components, such as vitamins, enzymes, volatiles and other. Herbal medicine is a growing field, and research continues to discover and find more information.

**Keywords**: Medicinal plants, secondary metabolites, therapeutic activity

## INTRODUCTION

According to World Health Organization (WHO), about 85% of the world population uses phytotherapeutic medicines for therapeutic purposes (Oliveira et al, 2006). Alternative methods have been used more, because of the lack of credibility in allopathic medicine and the low cost of phytotherapy (Alves, 2003). The growing use of medicinal plants by the population is due to low cost and easy access (Santos, 2011). The disseminated use of medicinal plants for many functions, it is of utmost importance to show that many adverse side effects, some very severe, were attributed to some species (Ernst, 1999). Some side effects such as allergic reactions, mutations, intoxication, teratogenesis, carcinogenesis and medication interactions may occur if the use of the phytotherapeutic or medicinal plant is unrestricted. Firstly we will introduce some historical facts about Phytotherapy. Secondly we will present the main compounds responsible for the pharmaceuticals activity and finally we will conclude.

## HISTORY OF PHYTOTHERAPY

Throughout the centuries and continents, people have learned about plants and their features. Traditional medicines (China, Indian, South America, Africa…) have been used since ancient times. Today, the effectiveness of medicine "by plants" is known and scientifically proven.The history of medicinal plants is as old as human history. The works left by all civilized tribes in the last 5000 years of the world indicate that they use plants in the treatment of diseases. These include Assyrians, Sumerians, Hittites, ancient Egyptians, and more recently Roman, Greek, Byzantine and Ottoman civilizations. The concept of phytotherapy originated with French physician Henri Leclerc, who first used the term in 1913 and who published various editions of the Précis de phytothérapie (“Handbook of Phytotherapy”), the first in 1922. The specific concept of phytotherapy was more of a recent classification, and started to grown in popularity thanks to a French

physician Henri Leclerc. He was the first to publish texts on Phytotherapy specifically. In then began to reach the English language as it was introduced by a herbalist and practitioner of homeopathy, called Eric Frederick William Powell. Later, in the 1960's, a German herbalist named Rudolf Fritz Weiss, began publishing his works on Phytotherapies as a form of herbal medicine.

## SECONDARY METABOLITES

Following basic discoveries in the field of organic chemistry, researchers such as A.-Lavoisier and C.W.Scheele conducted experimental research on herbs to learn more about the compounds found in herbal medicine. As a result of the research, it has been found that medicinal plant compounds are secondary metabolites. These metabolites are not necessary for plant growth, but are necessary for their survival. These compounds are named after the substance and are treated according to the following chemical structures.

**Table 1.** Seconder metabolites applications

| Plant Species | Substance (Class) | Mode of Action | Properties/Applications |
|---|---|---|---|
| *Aconitum napellus* | aconitine (A) | activates Na+ channels | analgesic |
| *Atropa belladonna* | L-hyoscyamine (A) | antagonist of mAChR | parasympathomimetic |
| *Camptotheca acuminate* | camptothecin (A) | inhibitor of DNA topoisomerase | tumour therapy |
| *Cannabis sativa* | tetrahydrocannabinol (T) | activates THC receptor | analgesic |
| *Catharanthus roseus* | dimeric Vinca alkaloids (A) | inhibit microtubule assembly | tumor therapy |

Alkaloids are found primarily in plants and are especially common in certain families of flowering plants. More than 3,000 different types of alkaloids have been identified in a total of more than 4,000 plant species. In 1819, pharmacist V. Meysner used an alkaloid for the first time. Alkaloids are mainly plant-based organic substances that cause precipitation reactions with reagents and may have low doses of physiological properties.In some plants, it is found only in fruits (morphine in poppy fruits not found in seeds). Others are found in leaves and flowers (nicotine found in tobacco leaves, not found in seeds). Plants containing this metabolite are usually passion flower, tobacco, shepherd's purse, celandine, crocus, comfrey, mistletoe, cinchona, poppy, belladonna, datura. Morphine is a powerful narcotic used for the relief of pain, and though its addictive properties limit its usefulness. Codeine, the methyl ether derivative of morphine found in the opium poppy, is an excellent analgesic that is relatively nonaddictive. Certain alkaloids act as cardiac or respiratory stimulants.

Anthraquinones are composed of anthracene groups, including the quinone group (benzoquinones, naphthaquinones and anthraquinones). The natural components of anthroquinone included in this group are used in the production of yellow, orange or red colors (Mammadov, 2014). More than 200 anthraquinones have been identified in plants, fungi and lichen (Mammadov, 2014). Anthraquinones are naturally found in some plants, such as cassia, rhubarb root, and aloe. They have a purifying activity, allowing increased intestinal peristalsis. Free anthraquinones absorb less energy and have less effect in water (Mammadov, 2014).

Flavonoids (latin flavus, yellow) are often colored substances found in plants. They are found as heterocytes in vacuoles or dissolved as components of specific plastids, chromoplasts (Guigniard, 1996). Flavonoids are a polyphenol compound found in every plant, giving the plants bright yellow, orange and red colors. We can basically collect flavonoids under two headings. (Tütem, 2014). Basically, we can collect flavonoids under two headings. These are antioxidants and anthocyanins. Antioxidant derivatives are flavon, flavonols (Tütem, 2014). Flavonoids family can be divided into six classes that differ in their chemical structure: flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones and anthocyanidins.The effect of flavonoids on thyroid hormone metabolism was discovered in studies of several substances of plant origin, chemically different from ascorbic acid, which have been reported to be beneficial in the control of hemorrhage, and have been referred to as 'vitamin P.' The ability of flavonoids to induce goiter was suggested from many studies involving various plants, e.g., peanuts (arachidoside) and millet (vitexin, glucosylorientine).

Coumarins were first isolated from Tonka beans by Vogel in 1820. The compound isolated from fragrant clover was later proved to be the same. Coumarins constitute a wide class of compounds found throughout the plant kingdom (Refat et al. 2009). For example; In various plants such as tonka bean, lavender, sweet clover grass and licorice root; It is found in foods such as strawberries, cherries, apricots and cinnamon. Although coumarin is colorless, some derivatives exhibit color and intense fluorescence. In addition, these coumarins are known to be beneficial in solar energy and lasers (Alghool, 2010). About 1,500 coumarins have been isolated since 1950. Coumarin is found in 150 species of 30 different families. They are fragrant compounds (Mud, 2005). 3- Phenylcoumarins have estrogenic activity. In addition, anticoagulant activity is determined in monomers and especially coumarin dimers. In recent years, coumarin derivatives such as Mammein, Geipavarin, Micromelin and coumarin derivatives have been isolated. Coumarins platelets are antibacterial and anticancer drugs (Sathisha et al. 2008), a steroid 5α-reductase inhibitor and an HIV-1 protease inhibitor (Romanelli et al. 2004). Coumarin or its metabolic products may be the basis for early treatment in scalding water scalding and other types of thermal injury.

Essential oils are mostly known for their antimicrobial activities. Since these oils are complex mixtures containing different components, their effect vary depending on the type and amount of active ingredients they contain (Toroğlu and Çenet 2006). Research has found the antibacterial, antifungal, antiviral, antioxidant and antimutagenic effects of essential oils of plants. Therefore, it is accepted that the use of essential oils and plant extracts may be one of the effective solutions (Bishop, 1995). In addition to antibacterial and antifungal properties, essential oils have antiviral activities (Bammi et al. 1997), which found that these oils are effective against the Epstein-Barr virus (EBV)(Bishop, 1995). *Melaleuca alternifolia* (tea) this tree's essential oil is an effective inhibitor of the mosaic virus found in tobacco.

Mucilage are different from chewing gums, however, resins are typically produced in response to injury and are secreted into cavities, while mucilage is produced inside very specific cells that accumulate between the cell wall and cell membrane. Injury in the tissues releases easily produced mucilage but does not produce it. Mucilage helps protect seed germination. Mostly, mucilage are used as pharmaceutical additives in different dosage formulations with wide range of applications such as thickening, binding, disintegrating agent, suspending and emulsifying agent in biphasic liquid dosage forms, stabilizing and gelling agents.

Very useful salicylic acid is the active ingredient of aspirin we know, and it is naturally present in various amounts in most plants, especially in various Spiraea species. Due to its crystal structure, it is generally used in the form of herbal hormones. Salicylic acid is used to help remove and prevent pimples and skin blemishes. Salicylic acid is also used to treat skin problems, including skin disease, which is caused by congenital causes of skin cells, ichthyosis, psoriasis which is a skin disease in which red crusted patches form in some parts of the body. Tannins (commonly referred to as tannic acid) are water-soluble polyphenols that are present in many plant foods. Herbal tannins are polyphenolic compounds that can tan the skin. Tannin is found in all organs of the plant. Tannins that settle in the frost in the tissue of the bud. While tannins in root tissue protect the roots of plant pathogens, seed tissue expands plant species and has allelopathic and bactericidal activity (Tanker, 1973).

The presence of saponins has been reported in more than 100 families of plants out of which at least 150 kinds of natural saponins have been found to possess significant anti-cancer properties. Saponins are a group of naturally occurring plant glycosides, characterized by their strong foam-forming properties in aqueous solution. Saponins, affect the immune system in ways that help to protect the human body against cancers, and also lower cholesterol levels. Saponins decrease blood lipids, lower cancer risks, and lower blood glucose response.

Arbutin is a natural secondary metabolite formed in the leaves of some species. Most often, it is an active ingredient in skin care and cosmetic products as a skin lightening agent for the prevention of melanin formation in various skin conditions, including hyperpigmentation or hyperactive melanocyte function in the skin. Antibacterial properties recommend using the leaves of *Arctostaphylos uvaursi* in the form of infusions for the treatment of infections of the urogenital system (cystitis, nephritis, gonorrhea, dometiosis). Most commonly, it is an active ingredient in skincare and cosmetic products as a skin-lightening agent for the prevention of

melanin formation in various skin conditions that involve cutaneous hyperpigmentation or hyperactive melanocyte function.

## CONCLUSION

Seconder metabolites have a broad spectrum of bioactivities. They often interact with the main targets in cells, such as proteins, biomembranes or nucleic acids. The multitarget activities of many SM can explain the medical application of complex extracts from medicinal plants for more health disorders which involve several targets. Herbal medicine is not a placebo medicine but a rational medicine, and for several of them clinical trials have shown efficacy. Quite a number of these Seconder Metabolites are presently been extracted from plants and are used in modern medicine as chemical entities with established applications.

## REFERENCES

Alghool S 2010. Metal complexes of azo coumarin derivatives: synthesis,spectroscopic, thermal and antimicrobial studies. Journal of Coordination Chemistry, 63(18), 3322-3333.

Alves AR, Silva MP 2003. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. Revista da Escola de Enfermagem da USP, v.37, n.4, p.85-91.

Bammi J, Khelifa R, Remmal A 1997. Etudes de l'activité antivirale de quelques huiles essentielles. In Proceedings of the Intern. Congr. Arom. Medicinal Plants & Essential Oils, Benjilali, B., Ettalibi, M., Ismaili-Alaoui, M., Zrira, S. (eds). Actes Editions, Rabat, Morocco, p.502.

Bishop CD 1995. Antiviral activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. Journal of Essential Oil Research 7(6): 641-644.

Ernst E 1999. Adverse reactions to herbal treatments. Journal of the Royal Society of Medicine 92, no.7, p.386.

Guigniard J 1996. Biochimie végétale; Lavoisier: Paris, 175 192.

Mammadov R. 2014. Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti. Ankara.

Oliveira MJR, Simoes MJS, Sassi CRR 2006. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 8, n. 2, p. 39-41.

Refat MS, El-Deen IM, Anwer ZM, El-Ghol S 2009. Bivalent transition metal complexes of coumarin-3-yl thiosemicarbazone derivatives: spectroscopic, antibacterial activity and thermogravimetric studies. Journal of Molecular Structure, 920, 149-162.

Romanelli GP, Bennardi D, Ruiz DM, Baronetti G, Thomas HJ, Autino JC 2004. A Solvent-free synthesis of coumarins using a Wells-Dawson heteropolyacid as catalyst. Tetrahedron Letters, 45, 8935-8939.

Santos MS, Ferreira F, Cunha AP, Carvalho AP, Macedo T 1994. An aqueous extract of valerian influences the transport of GABA in synaptosomes. Planta medica, 60(03), 278-279.

Sathisha MP, Shetti UN, Revankar VK, Pai KSR 2008. Synthesis and antitumor studies on novel Co(II), Ni(II) and Cu(II) metal complexes of bis(3-acetylcoumarin)thiocarbohydrazone. European Journal of Medicinal Chemistry, 43, 2338-2346.

Tanker MN 1973. Farmakognozi I, Özışık Matbaası İstanbul, 214p.

Toroğlu S, Çenet M 2006. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metotlar. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(2):12-19.

Tütem E 2010. Bitkisel gıdaların toplam antioksidan kapasiteleri ve başlıca fenolik bileşenleri, http://maycalistaylari.com.edu.tr/calistay2011yibo5/sunumlar/da%20nisman/esma_tutem.pdf(8/03/2019)

# Adaptation of plants to environmental stress conditions

Radia ABDOURAHMAN[1*], Mehmet SEZGİN[2]

[1*] Graduate School of Natural and Applied Sciences, Çankırı Karatekin University, Çankırı, Turkey
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Çankırı Karatekin University, Uluyazı Campus, Çankırı, Turkey

Corresponding author e-mail: diaabdi@hotmail.com

**Abstract:** The main point of this study is to evaluate the mechanisms of adapation of plant to environmental stresses. Environmental stress conditions are defined as abiotic stresses such as, drought, high soil salinity, heat, cold, oxidative stress and heavy metal toxicity are the common adverse environmental conditions. Those influencing stresses are the already present growth parameters in the environment that changed into a harmful way. Vegetables are grown world-wide in almost 200 countries. A world vegetable survey indicated 392 vegetable crops cultivated worldwide. Plants are fixed living organisms and thus their chance to immigrate whenever the weather, the soil or the air quality are not good is inexistent; due to that property vegetables always tend to adapt their organisms to the given environmental situation by resisting the effects of the stress. Unfortunately not all plants can win against all stress so they are called susceptible plants and die even sooner than expected. Reactive oxygen species (ROS) are chemically reactive chemical species containing oxygen; ROS has changed because they also participate in developmental processes of plants by acting as signaling molecules when the plant is exposed to an abiotic or biotic stress. But if their amount in the plant surpasses a certain amount they become very toxic for the plant and may even lead to their destruction. Plants are very clever living organisms and always respond to disadvantageous conditions by first using physicals barriers if not enough they express concerned genes and synthesize defensive chemicals in order to survive.Knowing that plants have always been widely used by humans, first as nutritive sources, but also as materials, decorative objects and for their effects (toxic or beneficial) on their health. Plants are essential for human's need and for $Co_2$ pollution problems, by supplying oxygen and absorbing $CO_2$ which explains the importance of large forests, especially tropical.

**Keywords:** abiotic stress, adaptation, resistance, susceptible, reactive oxygen species.

## INTRODUCTION

As sessile organisms, plants are continually exposed to disadvantageous environmental conditions of varying intensity and scales, including attack by pathogens, wounding by insects which is defined as biotic stress or exposure to ultraviolet radiation, and decrease in water and nutrient availability, a high concentration of salt and a very high or low temperatures that are considered as abiotic stress. It is very remarkable that despite the instability of their environment plants are able to adapt, overcome, and continue to grow, develop, and most importantly remain productive (Wang 2016). World population is growing at a very alarming rate and for 2030, the UN announces a World population of 8.5 billion which should stabilize at 11.5 billion inhabitants (Anonymous, 2015) On the other hand, agricultural productivity is not increasing at a required or necessary rate to keep up with the food demand. The reasons for this are water shortages, dying and not low quality soil fertility and mainly various abiotic stresses (Venkateswarlu and Shanker, 2011). Optimal growth conditions are a fundamental and obligatory principle in biology since living organisms cannot control environmental conditions, they were forced to evolve and cope with the instability of the present environmental growth conditions. In order to avoid further potentially injurious strains, plants adopted two major strategies for surviving adverse environmental conditions; stress avoidance or stress tolerance. The avoidance mechanism is mostly observed in the kingdom of animals, when they simply emigrate from the region of stressful stimuli. Plants don't own this kind of response mechanism, which is mobility; hence they have evolved intricate and complex biochemical, molecular and genetic mechanisms to avoid stress; else ways, tolerance mechanisms mainly involve biochemical and metabolic functions which are in turn regulated by genes. Understanding plant responses to abiotic stresses is crucial because this is the mandatory for developing approaches and tools to improve plant stress tolerance.

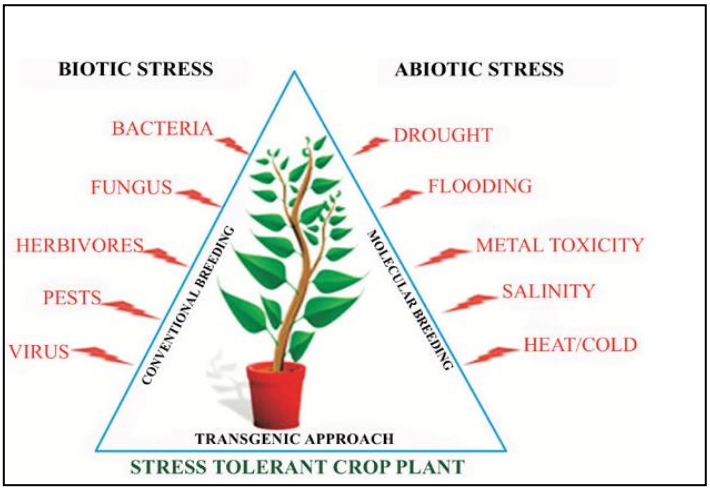



**Figure 1.** Biotic and abiotic stresses.

## Effects of abiotic factors to plants

Gathered fruits and vegetables can be potentially exposed to numerous abiotic stresses during production, handling, storage and distribution (Hodges, 2003). Some of these stresses can meaningless and not alarming, resulting in no quality or productivity loss, in some cases, in quality improvement (Hodges et al., 2005) during distribution. However, when the abiotic stress is moderate or severe scale, quality and crop productivity losses almost always are incurred (Toivonen, 2003a; Toivonen, 2003b). It is primordial to understand the relationship between preharvest (before the gathering of the ripen crops) abiotic stresses occurring during the plant's growth and postharvest (after the harvest of ripen crops) abiotic stresses that the fruit or vegetable is exposed after harvest and during storage and distribution, since the solution to these different problems will be best resolved by focusing on preharvest or postharvest abiotic stress amelioration, respectively. Moderate levels of preharvest stress can potentially work towards enhancing stress resistance of a fruit or vegetable through up-regulating genes and pathways which renders the tissues cross-tolerant to many stresses (Lesham and Kuiper, 1996; Bowler and Fluhr, 2000) which may occur subsequently in postharvest handling, storage and distribution. Drought, plant nutrition, extreme temperatures, salinity and light are the widely occurring preharvest abiotic stresses; extremes temperatures, low $O_2$ and high $CO_2$, desiccation are the known postharvest stresses (Venkateswarlu and Shanker, 2011).

## Effects of drought

The occurrence of drought stress during production of plants is becoming more frequent with climate change year after year (Whitmore, 2000). Drought is the absence of rainfall or supplemental irrigation for a period of time sufficient to deplete soil moisture, resource of groundwater and injure plants. Drought stress is observed when the quantity of water the plant loses exceeds the quantity of water that roots absorb and when the plant's water content is reduced enough to interfere with normal plant processes. As we know water is a very important biological component that plays an important role in the realisation of very vital biochemical processes .

$CO_2$ assimilation by leaves is reduced mainly by stomatal closure, membrane damage due to heat that comes along the dry and disturbed activity of various enzymes that demand optimal temperature in order to function, especially those of $CO_2$ fixation and transportable energy synthesis. Drought stress decreases $CO_2$ assimilation rates due to reduced stomatal conductance. It reduces leaf size, stems extension and root proliferation, disturbs plant water relations and reduces water-use efficiency. It disrupts photosynthetic pigments and reduces the gas exchange leading to a reduction in plant growth and productivity. Pushes metabolite flux through the photorespiratory pathway increases the oxidative load on the tissues as both processes generate reactive oxygen species which are cytotoxic elements and inhibits photosynthesis. Injury caused by reactive oxygen species to biological macromolecules under drought stress is among the major deterrents to growth (Farooq et al., 2009). Under environmental stresses such as drought, a rapid ROS accumulation including singlet oxygen ($O_2^-$), superoxide ($^{\bullet}O_2$), hydroxyl ($OH^{-1}$) and hydrogen peroxide ($H_2O_2$) may occur, leading to negative impact on antioxidant metabolism, and consequently cell peroxidation damage (Smirnoff, 1993).

**Mechanism of resistance to drought**

Drought triggers a wide variety of plant responses, ranging from cellular metabolism to changes in growth rates; aspects of drought induced changes are morphological, physiological and biochemical changes in plants. During prolonged water stress plants must be able to survive with low water content and maintain a minimum amount of water, through water uptake and retention. To cope with prolonged drought stress plants respond with energy demanding processes that alter the growth pattern, chemical content of the plants and the up or down regulation of genes; when plants suddenly encounter drought it is important to respond as quickly as possible. A faster drought response means that less water is lost and the survival rate of the plants is increased.

**Long term response**

Biochemical and growth changes occur in long term response, when the water availability is reduced in long term, plants change their biochemistry to be able to sustain as much water as possible and take up whatever water they can. During water stress plants produce and accumulate compatible solutes or Osmoprotectants they are small organic molecules with neutral charge and low toxicity at high concentrations that act as osmolytes and help organisms survive extreme osmotic stress such as sugars, polyols and amino acid to lower the osmotic potential in the cells to facilitate water absorption, uptake and retention (Xiong and Zhu, 2002). Some of the compatible solutes also contribute to maintaining the conformation of macromolecules by preventing misfolding or denaturation (Xiong and Zhu, 2002). A group of proteins called late embryogenesis abundant like (LEA) proteins are also produced during water stress. These LEA-like proteins are highly hydrophilic and highly soluble and have been found to be regulated by ABA (Xiong and Zhu, 2002). The LEA-like proteins are thought to act as chaperones, protecting enzymatic activities (Reyes et al., 2005) and preventing misfolding and denaturation of important proteins (Xiong and Zhu, 2002). Some of the LEA-like proteins have similar features as ribosomal proteins and are thought to interact with RNA (Garay-Arroyo et al., 2000). Many antioxidant systems, both enzymatic and non-enzymatic, are up-regulated in response to the increased reactive oxygen species levels during water stress. These antioxidants scavenge the reactive oxygen species and reduce the oxidative damage. The enzymatic antioxidants, such as superoxide dismutase, peroxidase, ascorbate peroxidase, catalase, polyphenol oxidase and glutathione reductase can detoxify reactive oxygen species (Prochazkova et al., 2001; Jaleel et al., 2009b). Drought causes cells to lose turgor pressure and shrink, the loss of turgor pressure in the cells inhibits turgor dependent activities such as cell expansion, which affects the growth of the whole plant. Some studies show that ABA can function as a signal to reduce leaf growth. In some cases drought can lead to the abscission of leafs in order to lessen the water lose surface and increase the root growth and by that teh area of water uptake become larger and deeper water resource can be attained.

**Short term response**

A faster drought response means that less water is lost and the survival rate of the plants is increased. The most important quick response is stomatal closure. Stomata consist of two guard cells surrounding the stomatal pore. When the stomata are open water is transpired and CO2 enter the leaf through the stomatal pore. During water stress the stomatal pore can be closed to reduce water loss. By closing the stomatal pore the water use efficiency is increased (Farooq et al., 2009).

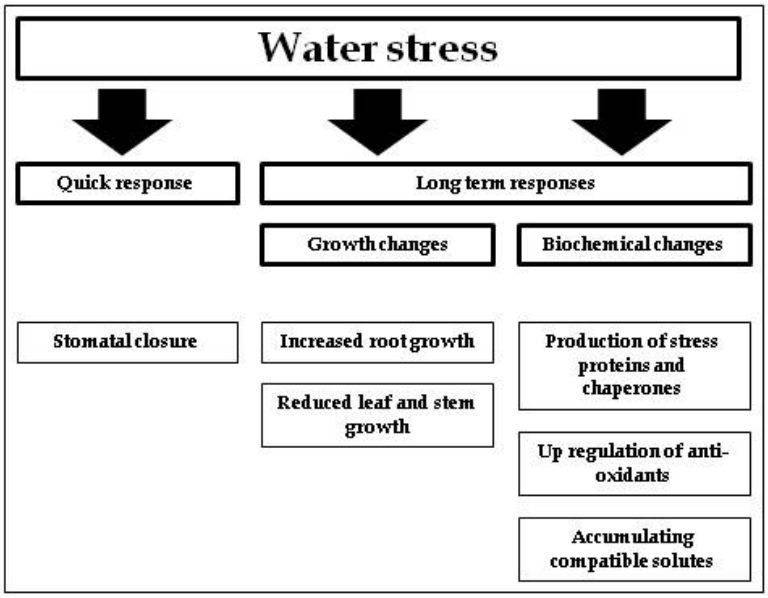



**Figure 2.** Plant responses to water stress

**Effect of extreme temperature**

Temperature is one of the main factors affecting the rate of plant development and crop productivity today as the climate change is getting more and more unpredictable. Every kind of plant species requests their own optimal and favorable temperature for their very ongoing biochemical ad vital processes. High temperature and low temperature have different effects on plant ant their growth but according to the plant species, whether yes or not the plant is resistant or susceptible or if the plant find it's optimal temperature in high or low temperatures; the effects as well as the plant responses are going to remain different. High light and heat stress most commonly come across a plant simultaneously since their occurrence require the same kind of environment, heated and dry with heavy sun lights, they both cause denaturation of vital biologic components, membrane damages and photorespiration that leads to ROS accumulation, apparition of necrosis, apparition of dark spot on leaves and stems, diminution of the amount of Nitrate Reductase enzyme in the roots; seed germinations are also inhibited. Cold or freezing stress is the result of very low temperatures that goes under $0^{o}$ C and it's a fact that fluid water transform into its solid for by condensation while forming crystals that gets bigger and larger, those crystals cause growth inhibition, negatively affects plasma and membrane properties, dehydration and frost that damages the plant. Living organisms can be classified into three groups, subject to the preferred temperature of growth (Figure 3). There are (a) Psychrophilic: which grow optimally at low temperature ranges between 0 and 10 °C; (b) Mesophylls: which moderate temperature and grow well between 10 and 30 °C; and (c) Thermophiles: which grow well between 30 and 65 °C or even higher (Launcher 1995).

**Plant response to heat stress**

Under heat stress conditions, plants evolve multiple mechanisms for surviving which include long-term adaptations and short-term avoidance. Long-term adaptation or tolerance are heritable modification to increase plant's fitness while short-term response are very temporary non-heritable physiological and biochemical gene expression. Avoidance mechanisms include processes such as changing leaf orientation, transpirational cooling, or alteration of membrane lipid compositions. Closure of stomata and reduced water loss, increased stomatal and trichomatous densities, and larger xylem vessels are common heat induced features in plant (Srivastava et al., 2012). Plants growing in a hot climate avoid heat stress by reducing the absorption of solar radiation. This ability is supported by the presence of small hairs (tomentose) that form a thick coat on the surface of the leaf as well as cuticles, protective waxy covering and reflecting the surplus and harmful light amount. In such plants, leaf blades often turn away from light and orient themselves parallel to sun rays (paraheliotropism); Solar radiation may also be reduced by rolling leaf lamina and decreasing the absorption area. When a plant uses the avoidance response her ultimate objective is to inhibit growth and focus more on the defensive matters while heat tolerance is generally defined as the ability of the plant to grow and produce economic yield under high temperature. They include short term avoidance/acclimation mechanism or long

term evolutionary adaptations. Some major tolerance mechanisms, including ion transporters, late embryogenesis abundant (LEA) proteins, osmoprotectants, antioxidant defense, and factors involved in signaling cascades and transcriptional control are essentially significant to counteract the stress effects (Rodrigez et al., 2005).

**Plant response to cold stress**

The expression of cold-responsive genes is induced during cold exposure. During this process, plants increase their tolerance to cold stress by synthesizing numerous protective substances (e.g. soluble sugars, proline) and proteins (e.g. LEA, AFP, CSP), Soluble sugars, proline and other lower-molecular-weight solutes function as osmolytes to protect plants from damage caused by cold stress (Ruelland et al., 2009). The accumulation of protective proteins including LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA) proteins, ANTI-FREEZING PROTEINS (AFPs) and COLD SHOCK PROTEINS (CSPs) during cold acclimation is important for freezing tolerance in plants (Ruelland et al., 2009). Several other LEA proteins were identified in different plant species, and proved that they are important factors in regulating plant chilling or freezing tolerance (Houde et al., 2004; Qiu et al., 2014; Sasaki et al., 2014; Liu et al., 2015).

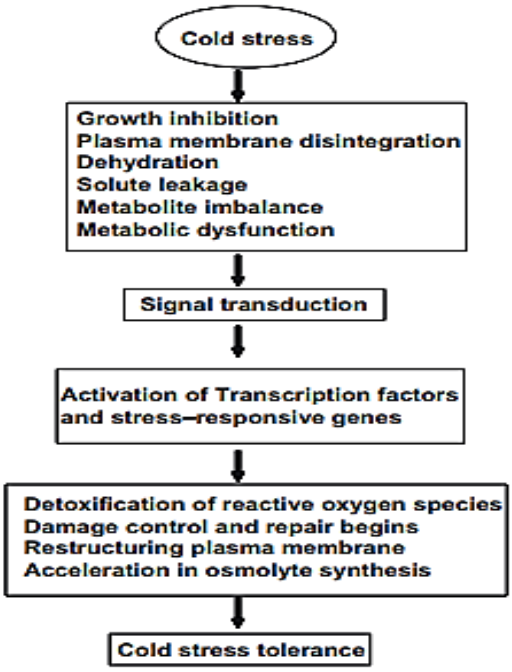



**Figure 3.** Fundamental response of plant to cold stress

**Effects of salinity stress**

Salinity is one of the most serious factors limiting the productivity of agricultural crops, with adverse effects on germination, plant vigour and crop yield (Munns and Tester, 2008), major processes such as photosynthesis, protein synthesis and energy and lipid metabolism are affected; high salinity affects plants in two main ways: high concentrations of salts in the soil decreases the capacity of roots to extract water, and high concentrations of salts within the plant itself can be toxic, leading to the inhibition of many physiological and biochemical processes such as nutrient uptake and assimilation (Hasegawa, et al., 2000; Munns, 2002; Munns, et al., 1995; Munns and Tester, 2008). When plant are present in favourable environmental conditions the water potential of the plant is higher than the potential hydrique of the soil which let the plant easily pump water from the soil but once the soil salinity increase they tend to restrain the uptake capacity of roots to uptake the quantity of necessary water. Thus salt stress causes osmotic and ionic disturbs which leads to ROS production and accumulation and decreases nutritive mineral uptake by the pant. The salt-induced inhibition of the uptake of important mineral nutrients, such as K+ and Ca2+, further reduces root cell growth (Larcher, 1980). Na+ accumulation turns out to be toxic especially in old leaves, which are no longer expanding and so no longer

diluting the salt arriving in them as young growing leaves do. If the rate at which they die is greater than the rate at which new leaves are produced, the photosynthetic capacity of the plant will no longer be able to supply the carbohydrate requirement of the young leaves, which further reduces their growth rate (Munns and Tester, 2008). In photosynthetic tissues, in fact, Na+ accumulation affects photosynthetic components such as enzymes, chlorophylls, and carotenoids (Davenport et al., 2005).

**Salt tolerance**

The mechanisms of genetic control of salt tolerance in plants have not yet fully understood because of its complexity, given this situation elaborate explanations will be very hard to be proposed but we will try to apprehend the mechanisms that plants actives when exposed to high salinity. Osmotic tolerance is a path of tolerance and it involves the plant's ability to tolerate the drought aspect of salinity stress and to maintain leaf expansion with their turgor and stomatal conductance (Rajendran et al., 2009). It was demonstrated in a study of genetic variation in tolerance to osmotic stress. Another essential mechanism of tolerance involves the ability to reduce the ionic stress on the plant by minimizing the amount of $Na^+$ that accumulates in the cytosol of cells, particularly those in the transpiring leaves. This process involves up and down regulation of the expression of specific ion channels and transporters, allowing the control of $Na^+$ transport throughout the plant (Munns and Tester, 2008; Rajendran et al., 2009). Separately stockage of $Na^+$ and $Cl^-$ at the cellular and intracellular level to avoid toxic concentrations within the cytoplasm is also a mechanism of tolerance, especially in mesophyll cells in the leaf (Munns and Tester, 2008) and synthesis and accumulation of compatible solutes hin the cytoplasm. Compatible solutes or osmoprotectants play a role in plant osmotolerance by various ways, protecting enzymes from denaturation, stabilizing membrane or macromolecules or playing adaptive roles in mediating osmotic adjustment (Ashraf and Foolad, 2007).

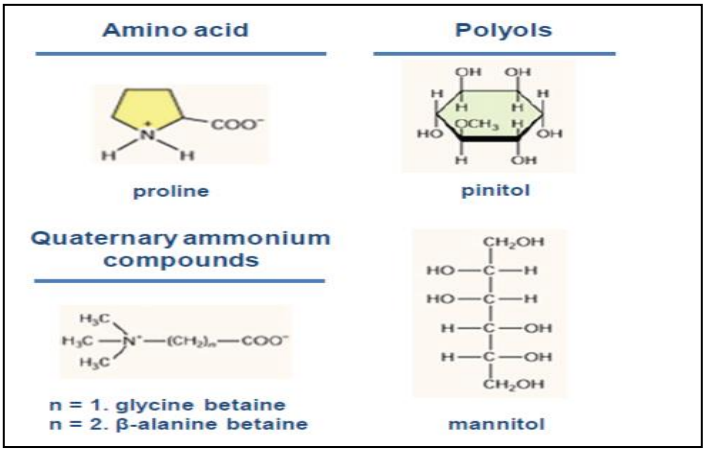



**Figure 4.** Chemical structures of some important osmoprotectants

## RESULTS AND DISCUSSION

Unlike animals plants are sessile living being and can't simply leave or emigrate from their environment whenever a lethal stress condition occurs. According to many proprieties such as the concerning species, its aptitude to cope with certain extreme environmental factors, stress effect and the plant response will be different. Some plants are halophyte while others are glycophytes, high salinity will cause toxic effects to the glycophytes plants while halophyte plants keep their growth rate increasing, in the other way halophyte plants will struggle in soil with low salt concentration while glycophyte plants will find their optimum conditions. The same logic goes for the rest of abiotic stresses. Some species are naturally resistance while other avoids any growth process while being confronted to stresses; susceptible plants rather die due to lack of responses mechanisms. Abiotic stresses are significant determinants of quality and nutritional value of fruits and vegetables during harvest, handling, storage and distribution to consumer. Further research is required to determine the key genes and molecular pathways that underpin the best tolerance responses crop genotypes to the common abiotic stresses. Important are the mechanisms that control water loss, high temperature and elevated salinity. This ability is especially important during stress confrontation, when loss of water can have serious consequences for the plants. Water stress can cause reduced growth and in severe cases plant death.

To minimize the negative effects of water stress the plants respond by changing their growth pattern, producing stress proteins and chaperones, up-regulation of anti-oxidants, accumulation of compatible solutes, increasing the amount of transporters involved in water and ion uptake and transport and by closing the stomata. Stress signalization pathways which involve ROS envolment lead to stress-responsive gene expression and physiological changes that gave to the plant tolerance aspect.

## CONCLUSION

The development and survival of all living things relies on the ability of organisms to perceive and respond to their environment. Responses to internal and external signals are frequently elicited by hormones, receptors and facteurs of transcription through a complex pathway of transductible signals. Once the signal is set out on to path of the nucleus, defensive responsible genes are then expressed with high rates and genes that are rather coding for not defensive purposes see their expression decreasing. As plants are exposed to diverse stresses their ability to overcome it gives to human being hope that even with the ever-changing climate there is always a solution for a stress effects and by that exposing to elite crops controllable stress effects will be benefic for plants to even evolve and be more prepared in the future; plant breeding which is the purposeful manipulation of plant species in order to create desired genotypes and phenotypes for specific purposes. This manipulation involves either controlled pollination, genetic engineering, developing hybrid species can be the solution for the distribution and propagation of the newly developed and wanted resistance characters.

## REFERENCES

Anonymous 2015. Available at : Demographique explosion https://fr.wikipedia.org/wiki/Explosion_d%C3%A9mographique [14.04.2020].

Bowler C, Fluhr R 2000. The Role of Calcium and Activated Oxygen as Signals for Controlling Cross-Tolerance. Trends in Plant Science, 241-246.

Davenport R, James R, Zakrisson-Plogander A., Tester M, Munns R 2005. Control of Sodium Transport in Durum Wheat. Plant Physiology, 137: 807-818.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita DAM 2009. Agronomy for Sustainable Development 29: 185–212.

Hodges DM 2003. Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops. Food Products Press.

Hodges DM, Lester GE, Munro KD, Toivonen PMA 2005. Oxidative stress: Importance for Postharvest Quality. HortScience, 39: 924-929.

Houde M, Dallaire S, N'Dong D, Sarhan F. 2004. Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. Plant Biotechnology Journal, **2**: 381–387.

Larcher W 1995. Physiological Plant Ecology.

Lesham YY, Kuiper,PJC 1996. Is There a GAS (General Adaptation Syndrome)Response to Various Types of Environmental Stress .Biologia Plantarum.

Munns, R. & Tester, M 2008.Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of PlantBiology, 59: 651-681.

Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC, Singh DV 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. Plant Science, 161: 765-771.

Rajendran K, Tester M, Roy S J 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. Plant, Cell & Environment, 32(3): 237-249.

Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA 2005. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. Plant Cell and Environment, 28: 709-718.

Rodríguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotechnol Appl,22: 1–10.

Ruelland E, Vaultier MN, Zachowski A, Hurry V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. Advances in Botanical Research, 49: 35–150.

Shanker KA , Venkateswarlu B 2011. Abiotic Stress in Plants. Mechanims and Adaptation.

Smirnoff N 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation.New Phytol, 125:27–58.

Srivastava S, Pathak AD, Gupta PS, Shrivastava AK, Srivastava AK 2012 .Hydrogen peroxide-scavenging enzymes impart tolerance to high temperature induced oxidative stress in sugarcane. J. Environ. Biol, 33:657–661.

Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF. 1997. *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain containing transcriptional activator that binds to the Crepeat/DRE, a cis acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proceedings of the National Academy of Sciences,94: 1035–1040.

Toivonen PMA 2003a. Effects of Storage Conditions and Postharvest Procedures on Oxidative Stress in Fruits and Vegetables. Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops, 69-90.

Toivonen PMA2003b. Postharvest Treatments to Control Oxidative Stress in Fruits and Vegetables. Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops, 225-246.

Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR 2007. Heat tolerance in plant. Environmental and Experimental Botany, 199-223.

Wang J 2016. The Multifaceted Roles of miR156-targeted SPL Transcription Factors in Plant Developmental Transitions. Plant Transcription Factors, 281-293.

Whitmore JS 2000. Drought Management on Farmland. Kluwer Academic.

Xiong L, Zhu JK 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell and Environment, 25: 131-139.

# Sekonder metabolitler

Sevde Büşra AKIN[1*], Mehmet SEZGİN[1]

[*1]Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Çankırı, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: sevdebusrakin06@gmail.com

**Özet**

Bu çalışmada bitkisel ürünler olan sekonder metabolitlerin önemi üzerinde durulmuş ve bu alanda elde edilen veriler güncel literatür taraması ile bir araya getirilmiştir. Bitkiler insanoğlunun yaşamını sürdürebilmesi için ihtiyaç duyulan temel besin kaynağıdır. Bitkiler, primer metabolitler olarak da bilinen besinlerin yanında çeşitli kimyasallar yani sekonder metabolitler de üretmektedir. Sekonder metabolitler başta ilaç sanayi olmak üzere, besin, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan oldukça önemli kimyasallardır. Örneğin digitoksin kardiovasküler tedavide, emetin amipli dizanteri tedavisi, kinin sıtma tedavisi, vinkristin kanser tedavisinde kullanılan ilaç etken maddelerinden birkaçıdır. Yine bitkilerden elde edilen çeşitli kimyasalların et, süt, meyve, sebze, deniz ürünleri ve meşrubat sektörlerinde tat ve koku verici olarak kullanılması bu sektörlerde doğal ürünlere duyulan talebi giderek arttırmaktadır. Sekonder metabolitlerin insan sağlığı ve beslenmesindeki öneminin yanında *Rosa* türlerinden elde edilen gül yağı, *Lavandula* türlerinden elde edilen lavanta yağı, *Jasminum* türlerinden elde edilen yasemin yağı parfüm ve kozmetik sanayinde de oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan çalışmalar ve elde edilen veriler, önceleri bitkiler tarafından oluşturulan ve hiçbir işlevi olmayan atık maddeler olarak kabul edilen bu kimyasalların hayatımızda ne denli önemli işlevlere sahip olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** İlaç etken maddesi, primer metabolit, sekonder metabolit

# Sekonder metabolites

**Abstract**

In this study, the importance of secondary metabolites, which are herbal products, was focused on and the data obtained in this field were combined with the current literature screening. Plants are the main food source needed for human life. Plants produce a variety of chemicals secondary metabolites, as well as foods also known as primary metabolites. Secondary metabolites are economically important chemicals in the food, cosmetic and agricultural fighting sectors, especially in the pharmaceutical industry. For example digitoxin, cardiovascular therapy; emetine, ammonia dysentery treatment; kinin, malaria treatment; vinkiristin are several of the drug active substances used in cancer treatment. Again, the use of various chemicals obtained from plants as taste and fragrance in the meat, milk, fruit, vegetables, seafood and soft drinks sectors increases the demand for natural products in these sectors. In addition to the importance of secondary metabolites in human health and nutrition, rose oil, obtained from *Rosa* species, lavander oil obtained from *Lavandula* species, jasmine oil obtained from *Jasminum* species also have a very important place in the perfume and cosmetic industry. Studies and the data obtained reveal the fact that these chemicals, which were previously created by plants and considered to be waste materials with no function, have such important functions in our lives.

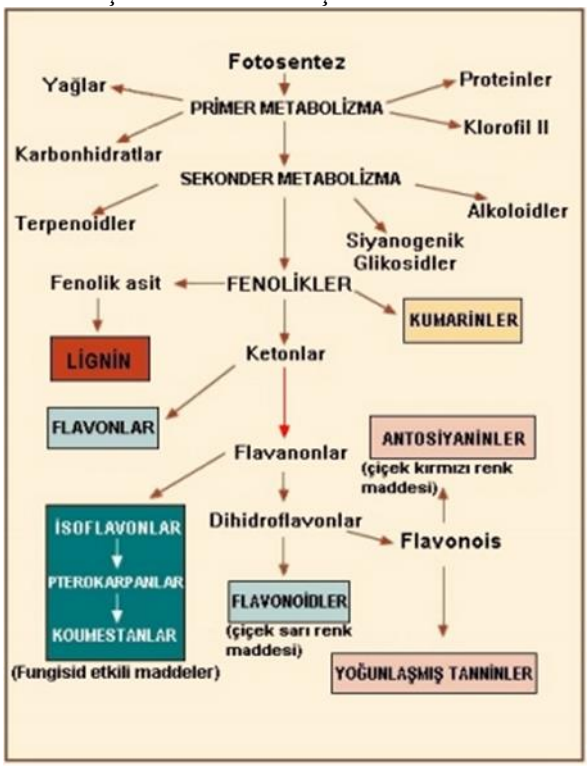
**Keywords:** Drug active substance, primary metabolit, secondary metabolit

## GİRİŞ

İnsanoğlu yaşamını sürdürebilmek için gereksinim duyduğu besinleri bitkilerden karşılar. Çünkü bitkiler, temel besin gereksinimlerini gidermek için gereken karbohidrat, protein ve yağların, yani primer metabolitlerin kaynağını oluşturmaktadır(Babaoğlu, Gürel ve Özcan, 2001). Metabolitler, hücrelerde doğal olarak bulunan çeşitli enzimler tarafından katalize edilen metabolik reaksiyonların ara ürünleridir ve primer ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılır. Primer metabolitler (Karbonhidratlar, yağlar, proteinler vb) doğada oldukça yaygın olup, yüksek bitkilerin tohum ile vejetatif dokularında oldukça fazladır ve hücre metabolizmasındaki temel görevlerinden dolayı, bitkinin fizyolojik gelişimi için gereklidirler (Cowan, 1999). Sekonder metabolitler ise primer metabolitlerden biyosentetik yollarla üretilmiş olup canlının temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az canlının temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili primer

metabolitler kadar önemli olan kimyasallardır (Şekil 1). Sekonder metabolitler bitki yaşamı için elzem olmamakla birlikte bitki herhangi bir stres faktörü (UV ışını, herbisit vs.) saldırısı ile karşı karşıya kaldığında savunma mekanizması olarak sentezlenmeye başlarlar.

Bitkiler âlemindeki dağılışı özel olan bir taksonomik grup (tür, cins, familya) ile sınırlandırılmış olan sekonder metabolit kavramı ilk defa Kossel (1891) tarafından primer metabolitlerin karşıtı olarak tanımlanmıştır. Theis ve Lerdau (2003) ise sekonder metabolitleri, bitkiler tarafından üretilen, fotosentez ürünü olmayıp, birtakım fizyolojik mekanizmaların fonksiyonlarıyla oluşan ve fotosentez ya da solunum gibi hayati fizyolojik olaylar için mutlak gerekli olmayan maddeler şeklinde tarif etmiştir.




**Şekil 1.** Bitkilerde primer ve sekonder metabolizma arasındaki ilişkiler (Morris ve Robbins, 1997)

## SEKONDER METABOLİTLERİN SINIFLANDIRILMASI

Birincil metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilen ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılan sekonder metabolitler temelde terpenler, fenoller ve azot ve/veya kükürt içeren bileşikler olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar (Tablo 1) (Bourgaud et al., 2001; Agostini-Costa et al., 2012). İkincil metabolitlerin; kimyasal yapıları (halka yapısı, şeker içeriği), bileşimi (nitrojen içerip içermediği), değişik çözücülerdeki çözünebilirliği veya sentez şekli (örn. taneleri oluşturan fenilpropanoidler) temel sınıflandırmasıdır. Basit sınıflandırma ise başlıca 3 grup içermektedir: Terpenler (mevalonik asitten üretilir, karbon ve hidrojenin bileşimiyle oluşur), fenolikler (basit şekerlerden oluşur, benzen halkaları, hidrojen ve oksijen içerir) ve nitrojen içerikli bileşikler (oldukça çeşitlidir, sülfür içerebilirler) (Anonim 1).

**Tablo 1** Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması

| Tip | Örnek |
|---|---|
| **Terpenler** | |
| Monoterpen | Mentol |
| Seskiterpen | Limonen |
| Diterpen | Taksol |
| Triterpen | Digitanin |
| Tetraterpenler | Karoten |
| Politerpenler | Dolikol |
| **Fenoller** | |
| Ligninler | Lignin |
| Tanenler | Gallik Asit |
| Flavonoidler | Antosiyanin |
| Kumarinler | Furanokumarinler |
| **Azot ve/veya kükürt içeren bileşikler** | |
| Alkoloidler | Nikotin |
| Glukozinolat | Sinigrin |

**Sekonder metabolitlerin bitkiler açısından önemi**

Sekonder metabolitler, bitkilerin değişen çevre koşullarına uyumunda önemli rol oynar ve oluşan stres etkilerinin üstesinden gelirler (Edreva et al.,2008). Önceleri bitki yaşamı boyunca değişmeden biriken inaktif atık ve depo ürünleri olduğuna inanılan sekonder ürünlerin bitkideki fonksiyonları tartışmalı olsa da bu konuda bilim adamlarını birleştiren ortak görüşler şöyledir (Verpoorte, Heijden, Hoge, ve Hoopen, 1994; Teli,ve Timko, 2004; Lila, 2005):

• Bitkiyi herbivor, bakteriyal ve fungal patojen saldırılarına karşı korur, aynı ortamdaki diğer bitkilerle rekabet güçlerini artırır (Osbourn, 1996). Örneğin 1980 yılında yapılan bir çalışmada yaban tavşanının bitki kısımlarını yerken bitki türleri, bitkinin gelişim dönemleri, bitki kısımları konusunda seçici davrandığı keşfedilmiş ve bu durumu sekonder metabolitlerle bağdaştırmışlardır. Monoterpenler, triterpenler ve fenoller tavşanın bitkiyi yemesini engellemektedir (Bryant et al., 1992). Başka bir örnek verilecek olursa; Diterpenlerinde toksik olduğu belirlenmiş bunlar birçok çam ve baklagil familyasında bulunmuştur. Gövdedeki çamsakızı kanalları ısırıldığında hava ile temas eden reçine sertleşir, sonra yaranın üzerini kapatır. Böylece hayvanlar tarafından yenmeyi engeller. Sütleğen familyasındaki bitkiler pobol diterpenini üretir ve bu maddeler memeliler için toksik olduğu kadar cilt hassasiyetini de beraberinde getirir (Ünay, 2004).

• Tozlanmada faydalı organizmaları (özellikle böcekleri) çeker, simbiyotik ilişkilerde görev alır (Briksin, 2000). Örneğin Fenilpropen olan eugenol, fenilpropanoidlerin bir üyesidir. Likit sarı renkli yağ özellikle karanfil yağından, hindistancevizi, tarçın, reyhan ve defne yaprağından elde edilmektedir. Karanfilin aromasını veren eugenol % 72-90 oranıyla başlıca bileşiktir (Anonim 2). Eugenol ve methoxifenol türevleri böcek cezbedici ve UV ışınlarını emici, biyoside, ve antiseptik olarak kullanılır (Schiestl, 2003).

• Bitkiyi sıcaklık değişimleri, su, ışık, ultraviyole ve mineral madde gibi abiotik stress faktörlerine karşı korur. Örneğin Chapin 1980'e göre, ışık eksikliğinde fotosentez azalmakta ve sonuç olarak da karbonhidrat konsantrasyonu azalmakta ve böylelikle büyüme karbon tarafından sınırlanmaktadır. Genellikle büyüme oranındaki azalma, besin elementlerinin alımındaki azalmadan daha büyük oranda olmaktadır. Bu yüzden, yapraklardaki ve sürgünlerdeki azot konsantrasyonu, büyümeyi sağlayacak gerekli oranın üzerinde depolanır. Bu koşullar altında, çoğu defa karbon temelli sekonder metabolit konsantrasyonunda bir azalma ve azot içeren sekonder metabolitlerin konsantrasyonunda ise bir yükselme olmaktadır, çünkü böyle koşullar altında azot karbona oranla oldukça "ucuza mal olmaktadır" (Bryant et al., 1983; Bryant et al., 1992).

• Hücre düzeyinde bitki büyüme düzenleyicileri, gen ekspresyon düzenleyicileri ve transdüksiyon mekanizmalarında görevlidirler.

İkincil metabolitler, bitkide savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi çevresel koşullara uyum faaliyetleri esnasında üretilmekte olup bazıları geniş miktarlarda üretilirken, bazılarının üretimi ise

sınırlı düzeyde kalmakta hatta bazı metabolitler sadece belirli türlerde üretilmektedir. Çoğunlukla bitkilerin belli organlarında bulunurlar ve bitkinin belli bir gelişim periyodu süresince üretilirler (Verpoorte et al., 1999; Sökmen ve Gürel, 2001).

**Sekonder metabolitlerin insanlar açısından önemi**

Bitkilerden izole edilen 100000'nin üzerinde sekonder ürünün bitkilerdeki çeşitli fonksiyonlarının dışında diğer bazı canlılarda da biyoaktif bileşenler olabileceği tespit edilmiştir (Tablo 2). İkincil metabolitler, bitkilere besin olmanın yanında, uyarıcı, içecek, baharat, lif, ilaç, şifalı bitki özü, zehir ve psikoaktif madde özelliği kazandırır.

**Tablo 2.** Sekonder metabolitlerin kullanım alanları (Wink, 2009)

| Kullanım alanı | Sekonder metabolit |
|---|---|
| Boya | İndigo, shikonin |
| Baharat | Vanilin, capsaicin, hardal yağı |
| Koku | Gül, lavanta, diğer uçucu yağlar |
| Uyarıcı | Kafein, nikotin, efedrin |
| Halüsinojenler | Morfin, kokain, scopolamin, tetrahidrocannabinol |
| İnsektisit | Nikotin, piperin, pyrethrin, rotenone |
| İnsan ve hayvan zehiri | Coniine, strychnine, aconitine, colchicine, kardiyak glikozitler, |
| Tedavi edici | Atropin, quinine, cardenolide, codein |

**İnsan sağlığı üzerine etki eden sekonder metabolitler**

Günümüzde modern ilaçların %20'si geleneksel tıbbi bitkilerden hazırlanmaktadır. Başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde bitkisel kaynaklı maddelerden ilaç etken maddesi olarak yararlanılmaktadır. Bazı ikincil metabolitler ve insan sağlığına etkileri Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 3.** Bitki doku kültürlerinden sentezlenen bazı değerli sekonder metabolitler ve sağlık üzerine etkileri

| Bitki Doku Kültürü | Sekonder Metabolit | Özellik | Referans |
|---|---|---|---|
| Coleus blumei | Rosmarinik asit, kafeik asit | Antioksidan, hepatoprotektif aktivite, antimutajen, antidepresif, | Vukovic ve Curkovic, 2013 |
| Cichorium intybus | Neolignan glukosid kafeik asit | Antioksidan, aneljezik, sedatif, anti-inflamatuvar | Malarz , Stojakowska, Szneler ve Kisiel, 2013 |
| Arabidopsis thaliana | Desulfo-GI,dolikol, poliprenol, β-sitosterol, stigmasterol, kampestero | Antikanserojen, anti-patojen ROS'a karşı koruyucu etki, kemoterapötik | Luczak, Forlani ve Papenbrock, 2013 |
| Podophyllum hexandrum | Gümüş nanopartikülleri (AgNPs) | Antimikrobiyel, antitümör etki | Imbert, 1998 |
| Panax ginseng | Gingsenosid | Antioksidan, anti-diyabetik ajan, anti-kanser | Wang, Man, Gao, Zhang ve Huang, 2013 |
| Ceropegia bulbosa Roxb | Cerpegin | Hepatoprotektif, antipiretik, anti-ülser, analjezik, sakinlefltirici, | Phulwaria, Shekhawat, Rathore ve Singh, 2013 |
| Glycyrrhiza | Triterpenler | Anti-oksidatif, anti-inflamatuvar, anti-kanserojen, antiviral | Man, Wang, Gao, Guo, Li, Zhang ve Xiao, 2013 |
| Saussurea involucrata | Sirinjin, klorojenik asit | Anti-inflamatuvar, antinosiseptif, hipoglisemik etki, antidepresan | Chen, Liu, Zou, Yang ve Dai, 2013 |

**Gıda katkı maddesi olarak kullanılan sekonder metabolitler**

Sentetik katkı maddelerinin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerinin ortaya çıkışı ile birlikte et, süt, meyve, sebze, deniz ürünleri ve meşrubat sektörlerinde doğal ürünlere duyulan talep giderek artmaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde sebzelerin besin kalitesi sekonder metabolit içeriklerine bakılarak tayin edilmektedir. Besin katkı maddesi olarak kullanılan bazı ikincil metabolitler Tablo 4'de verilmiştir.

**Tablo 4.** Bitkilerden elde edilen çeşitli sekonder ürünlerin gıda katkı maddesi olarak kullanımı.

| Renklendiriciler | Esansiyel Yağlar | Tatlandırıcılar | Lezzet Vericiler |
|---|---|---|---|
| Antosiyaninler | Nane yağı | Steviosid | Vanilin |
| Betalainler | Biberiye yağı | Gliserin | Sarımsak |
| Krokin | Yasemin yağı | Thaumatin | Soğan |
| Karotenoitler | Anason yağı | | Hint pirinci |
| Antrakinonlar | | | Turunçgil |

**Parfümeri ve zirai mücadele kullanılan sekonder metabolitler**

Bitkisel kökenli ürünlerden özellikle parfüm olarak yararlanılması da çok eski tarihlere kadar dayanmaktadır. Örneğin, *Koşa* (gül) bitkisi türlerinden gül yağı, *Kavandula* bitkisinden lavanta ve *Fasminum* türlerinden yasemin ilk çağlardan beri bilinen ve bugün bile parfüm ve kozmetik sanayinde önemli yeri olan bitkisel ürünlerdir. Son yıllarda bitkisel kökenli doğal ürünler zirai mücadele amacıyla da kullanılmaktadır (Tablo 5). Zararlılar ile mücadelede kullanılan pestisitlerin büyük bir kısmının ithal edilmesi bitkisel üretim maliyetinin artmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda tarımsal üretimde elde edilen ürünün uluslararası piyasalarda rekabet etme şansı düşmektedir. Pestisitler; pest (haşerat) adı verilen zararlı canlıları, öldürmek için kullanılan maddelerdir. İnsektisitler ise pestisitlerin bir alt grubu olup zararlı böceklerle mücadelede kullanılan kimyasallardır (Yamanel ve Çakır. 2004). Yüksek oranda pestisit kullanımının ekonomik etkisinin yanında, çevre ve insan sağlığı üzerinde de olumsuz yönde etkileri bulunmaktadır (Karaca ve Gökçe, 2014). Özellikle böcekler bitkisel üretimde, kültür bitkilerinin verim ve kalitesini azaltan etmenler arasında önemli bir yere sahiptir. Bitkisel üretimde ekonomik yönden oldukça büyük rakamlara ulaşan kayıpların önlenmesi için, bitki koruma çalışmalarının iyi bir şekilde planlanması ve yürütülmesi gerekmektedir. Ülkemizde de zararlılar ile mücadele genellikle kimyasal mücadele şeklinde yürütülmektedir.

Yüzyıllardır insanoğlu hem tarlada hem de hasat sonrası depodaki ürünlerini böcek ve diğer zararlılardan korumak için değişik yöntemler kullanmışlardır. Alternatif mücadele yöntemleri içerisinde bitkilerden elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağlar zararlılarla mücadelede önemli bir yer tutmaktadır. Bitkilerden elde edilen uçucu yağların zararlılara karşı toksik, uzaklaştırıcı (repellent), beslenmeyi engelleyici (antifeedant), gelişme ve çoğalmayı engelleyici etkiler gösterdiği ortaya konmuştur (Topuz ve Madanlar, 2006).

Bitkilerin, insektisitler için önemli potansiyel kaynaklar olduğu birçok araştırıcı tarafından ispatlanmıştır. Bu gün 2000'den fazla bitkinin tarımda zararlı olan böceklere karşı çeşitli şekillerde etkili olduğu bilinmektedir (Öncüer, 1995). Bu kadar çok bitkinin insektisit etkisinin olduğunun bilinmesine karşın pratikte yararlanılanları çok az sayıdadır. Bunun nedenleri, doğal kaynakların kısıtlı olması, standardizasyon ve ruhsat almadaki zorluklar ve ilaç sektöründe sentetiklerin kullanımındaki kolaylıklar olduğu kanaati yaygındır.

**Tablo 5.** Endüstride kullanılan bitkisel kökenli diğer doğal ürünler (Stafford, 1991).

| Ürün | İşlevi |
|---|---|
| **Parfüm ve kozmetik** | |
| Yasemin yağı | Parfüm |
| Gül yağı | Parfüm |
| Lavanta yağı | Parfüm ve kozmatik |
| **Zirai Mücadele** | |
| Piretrin, Sinerin, Yasmolin | İnsektisit |
| Nikotin | İnsektisit |
| Anakardik asit | Molluskusit |

## Tartışma ve Sonuç

Bitkiler, yapı ve fonksiyonları farklı olan çok sayıda kimyasal madde üretmektedirler. Bunlardan 'Sekonder Metabolitler' olarak adlandırılan kimyasalların çoğunun yapı ve fonksiyonları bilinmektedir. Endüstriyel alanda sıklıkla kullanılan ikincil metabolitler tıpta ağrı kesici, yatıştırıcı, kas gevşetici ilaçlar (morfin, atropin, papaverin gibi), enfeksiyoz hastalıklara karşı antimikrobiyaller; zirai mücadelede insektisitler (nikotin, rotenon gibi); gıda koruma maddeleri olarak kullanılan pek çok kimyasal bulunmaktadır. Primer metabolitlerden (karbonhidrat, yağ, protein) çeşitli biyosentetik yollarla bitkiler tarafından üretilen Sekonder metabolitlerin doğal ürünler olmaları kullanıldıkları alanlarda avantajlar sağlamaktadır. Ülkemiz bitki florası açısından oldukça zengin bir konuma sahiptir, dolayısıyla bu önemli bileşiklerin izolasyonu, saflaştırılması, kimyasal yapılarının belirlenmesi, hücre kültürlerinin yapılması vb. konulardaki araştırmaların arttırılması söz konusu alanlarda önemli gelişmeleri beraberinde getirecektir.

## Kaynaklar

Anonymous 1 2020. http://www.biologyreference.com/Re-Se/Secondary-Metabolites-in-Plants.html

Anonymous 2 2020. http://www.biologyreference.com/Re-Se/Secondary-Metabolites-in-Plants.html

Agostini-Costa T, Vieira R, Bizzo HR, Silveria D, Gimenes MA (2012). Secondary metabolites. Dr. Sasikumar Dhanarasu (Edt), Chromatography and Its Applications. Brazil, pp: 131-164.

Babaoğlu, M, Yorgancılar M, Akbudak MA 2001. Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.1-35.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 5: 839-851.

Bryant JP, Reichardt PB, Clausen TP 1992. http://www.doa.gov.tr/doadergisi/doa13/ ODUNSU.pdf (Çeviren: A. Haluk Türker).

Cowan MM 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents Clinical Microbiology Reviews, 12: 564–582.17.

Chen R, Liu X, Zou J, Yang L, Dai J 2013. Qualitative and quantitative analysis of phenylpropanoids in cell culture, regenerated plantlets and herbs of Saussurea involucrata. J Pharm Biomed Anal, 74: 39-46.

Edreva A, Velikova V, Tsonev T, Dagnon S, Gürel A, Aktaş L, Gesheva E 2008. Stress-Protective Role of Secondary Metabolites: Diversity of Functions and Mechanisms. Gen. Appl. Plant Physology. Special İssue, 34(1-2), 67-78.

Imbert F 1998. Discovery of podophyllotoxins. Biochimie 80, 207-222.

Lila MA 2005. Valuable Secondary Products from In Vitro Culture. Chapter 24: Plant Development and Biotechnology. CRC Pres, pp:285–289.

Luczak S, Forlani F, Papenbrock J. 2013. Desulfo-glucosinolate sulfotransferases isolated from several Arabidopsis thaliana ecotypes differ in their sequence and enzyme kinetics. Plant Physiol and Biochem 63: 15-23.

Malarz J, Stojakowska A, Szneler E, Kisiel W. 2013. A new neolignan glucoside from hairy roots of Cichorium intybus. Phytochemistry Lett 6: 59-61.

Man S, Wang J, Gao W, Guo S, Li Y, Zhang L, Xiao P. 2013. Chemical analysis and anti-inflammatory comparison of the cell culture of Glycyrrhiza with its field cultivated variety. Food Chem, 136: 513-517.

Morris P, Robbins M 1997. Manipulating the chemical composition of plants. http://www.aber.ac.uk/en/media/ch2.pdf (Erişim tarihi: 04/02/2009).

Osbourn AE 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. The Plant Cell, 8: 1821– 1831.

Öncüer C 1995. Tarımsal zararlılarla savaş yöntemleri ve ilaçlar. Ege Üniversitesi Basım Evi., pp 333.

Phulwaria M, Shekhawat NS, Rathore JS, Singh RP 2013. An efficient in vitro regeneration and ex vitro rooting of Ceropegia bulbosa Roxb-A threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert. Industrial Crops Prod, 42: 25-29.

Schiestl FP, Roubik DW 2003. Odor compound detection in male euglossine bees. Journal of Chemical Ecology, 29 (1): 253–257.

Sökmen A, Gürel E (2001). Sekonder Metabolit Üretimi. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 211-261.

Stafford A 1991. Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. In: Stafford A, Warren G (eds), Plant Celi and Tissue Culture, pp. 124-162, Öpen University Press, Milton Keynes.

Teli NP, Timko MP 2004. Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 79:125–145.

Theis N, Lerdau M 2003. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. International Journal of Plant Sciences, 164: 93–102.

Topuz E, Madanlar, N 2006. Bitkisel Kökenli Eterik Yağlar ve Zararlılara Karşı Kullanım Olanakları. Batı Akdeniz TarımsalAraştırma Enst; 23: 54-66.

Ünay A 2004. Ürün Fizyolojisi Ders Notları. Adnan Menderes Üniversitesi Yay.

Verpoorte R, Heijden R, Hoopen HJG, Memelink J 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnology Letters, 21: 467–479.

Verpoorte R, Contin A, Memelink J 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry Reviews, 1: 13–25.

Vukovic R, Bauer N, Curkovic-Perica M 2013. Genetic elicitation by inducible expression of cryptogein stimulates secretion of phenolics from Coleus blumei hairy roots. Plant Sci, 199-200; 18-28.

Wang j, Man S, Gao W, Zhang L, Huang L 2013. Cluster analysis of ginseng tissue cultures, dynamic change of growth, total saponins, specific oxygen uptake rate in bioreactor and immunoregulative effect of ginseng adventitious root. Industrial Crops Prod, 41: 57-63.

Waterman PG 2001. Evolution of Secondary Plant Metabolism. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom, 9.

Wink M 2009. Chapter 1 Introduction. Annual Plant Reviews 39,1-20.

Yamanel Ş, Çakır Ş 2004. Türkiye'nin Bazı Karasinek (Musca domestica L.) Populasyonlarında Organofosfatlı İnsektisidlerden Metil Paration ve Diazinona Karşı Gelişmiş Direnç. Türk Parazitol Derg 28: 210-4.

Verpoorte R, Heijden R, Hoge JHC, Hoopen HJG 1994. Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. Pure and Applied Chemistry, 66:2307-2310.

# Impact of particle size on physical and tablet properties of eggshell powders

Dilara Akarca*, Nazlı Savlak

Manisa Celal Bayar University, Department of Food Engineering, Muradiye, MANİSA

*Corresponding author email: akarcadilara@gmail.com

**Abstract**

Eggshell is an important waste of pasteurized egg industry. Calcium is very important as it is the most abundant mineral (40%) in the eggshell. In the recent years, with the increase of pasteurized egg production, there has been an increase in eggshell waste of egg factories and waste management has become difficult. In this study, utilization of eggshell for human consumptipn was targeted and eggshell with different particle sizes (< 355 µm, 355 – 500 µm, < 500 µm) were used for Ca source tablet production. Physical properties (bulk density, tapped density, Carr Index, Hausner ratio) and tablet properties (weight, thickness, hardness) of eggshell powders were determined. Eggshell powders from all particle sizes had good flowability. Tablet weight, thickness and hardness increased with increasing particle size. Eggshell powders between 355 – 500 µm and under 500 µm was the most suitable particle size in terms of tablet hardness.

**Keywords**: eggshell, calcium, tablet, particle size, waste management

## INTRODUCTION

Calcium constitute 1.9 % of human body weight and is the 5th most abundant element in the human body. Calcium needs to be in the diet for some physiological processes such as skeletal mineralization, muscle contraction, nerve impulse conduction, blood clotting and hormone secretion. (Peacock, 2010). Eggshell constituing 9-12% of the total egg weight, is mainly formed of calcium (Ca) and strontium (Sr) minerals, as well as magnesium (Mg), phosphorus (P), zinc (Zn), iron(Fe) and selenium (Se). Calcium carbonate ($CaCO_3$) in eggshell is the most preferred Ca salt as a food supplement as it is the most abundant mineral (40%) in the eggshell.

Enrichment of food with eggshell is a good way of taking Ca with the diet. Eggshell was demonstrated by researchers as a suitable Ca source for human nutrition. However, the number of studies on utilization of eggshell in food enrichment is limited. Mijan et al. (2014) supplemented yoğurt with nano sized eggshell powder and reported that this prolongs the shelf life of yogurt. In sensory evaluation, yogurts supplemented with nano sized eggshell powder had less sour and more harsh taste than control. Fina et al. (2016) added eggshell powder and kefir grains to milk. Hassan (2015) supplemented biscuits with eggshell and determined their chemical, physical, sensory properties and effects on mineral bioavailability. It has been stated that biscuits with eggshell powder had increased Ca content.

Enriching foods is a good way to intake functional components or micronutrients that are lacking in society. But it may be necessary to consume too much of food in order to provide enough nutrients. Food supplements are another way to take nutrients at once and in excess quantities as an alternative to enriching foods with micronutrients. Today, the tablets are superior in that they are easy to manufacture in adjustable dosages and maintain their stability with respect to oral liquids. These features make tablets more preferred (Gonnissen et al., 2007). In addition, tablet production with direct compression method has advantages such as low labor costs, processing time, low energy consumption and high patient compliance. These features make it more preferable for dosage forms (Gallo et al., 2011). However, there are only a few studies on utilization of eggshells in production of calcium source tablets. Render et al. (2016) carried out *in vivo* studies by tabletting the $CaCO_3$ nanoparticles they obtained from the eggshell. Dolińska et al. (2016) investigated the kinetics of calcium release from tablets obtained from egg shells in the form of calcium citrate and calcium carbonate. In another study, Gaonkar and Chakraborty (2016) studied obtaining fertilizer and calcium supplement from egg shell. They concluded that chicken eggs were a rich source of

calcium and they could be used very effectively in various applications. Lee et al. (2016) has carried out a study on nano sized eggshell powder and oyster shell powder added dairy tablets. It was determined that the appearance, aroma, taste, texture and cumulative sensory scores of Ca supplemented tablets were similar to control tablets.

Particle size properties are of great importance in tablet press. Because as the particle size decreases, the powders become more cohesiveness and show poor flow characteristics. This causes problems in stages such as processing, transport, and usage. The particle size affects the properties of powders in tablet press, such as flowability and adhesion (Dozan et al., 2014). To the best of authors' knowledge, effect of particle size on cohesiveness, flowability and other physical properties as well as tablet forming properties of eggshell powders were not determined before. In this study, eggshell with different particle sizes (< 355 µm, 355 – 500 µm, < 500 µm) were used for Ca source tablet production. Effect of eggshell particle size on physical properties (bulk density, tapped density, Carr Index, Hausner ratio, compressibility) and tablet properties (weight, thickness, hardness) of eggshell powders was determined.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

The eggshells used in the study were obtained from Keskinoğlu Poultry and Hatchery Ind. Inc., Manisa, Turkey. Eggshells (20 kg) were supplied from the pasteurized liquid egg production line in 3 replications representing all the eggs used in production.

### Methods

### Eggshell Powder (ESP) Production

Before obtaining the eggshell powder, the eggshells were sterilized in an autoclave at 121 °C, for 15 minutes. Eggshells were washed to get rid of dirt and other organic substances. They were dried in an oven (Memmert, Germany) at 85 °C for about 4 hours and then ground using a blade grinder (Retsch, GM 200, Germany). Ground and dried eggshells were sieved (Loyka, Turkey) in order to obtain ESP under 355 µm, between 355 – 500 µm and under < 500 µm. They were filled in plastic bags and stored at room temperature for powder analysis and tablet production.

### Eggshell Powder Analysis

### Bulk density and tapped density

The bulk density ($\rho_{bulk}$) of eggshell powder was determined by measuring the weight of the eggshell powder and corresponding volume. Approximately 10 g of ESP was transferred to 10 mL graduated cylinder. The bulk density was calculated by dividing the mass of the ESP by the volume occupied in the cylinder. For the tapped density ($\rho_{tapped}$), graduated cylinder was tapped to constant volume by a glass rod. The volume of eggshell powder was used in mass/volume calculation (Jinapong et al., 2008).

### Carr index (flowability) and Hausner ratio (cohesiveness)

Flowability and cohesiveness of ESP were expressed in terms of Carr index (CI) (Carr, 1965) and Hausner ratio (HR) (Hausner, 1967), respectively. The following equations were used to reach CI and HR values (Zaman et al., 2013);

$$CI = (\rho_{tapped} - \rho_{bulk} / \rho_{tapped}) * 100 \quad (1)$$

$HR = \rho_{tapped} / \rho_{bulk}$ (2)

Powder properties are classified according to HR and CI values. Hausner ratios < 1.2 are classified as low cohesive group; HR between 1.2 - 1.4 are considered as intermediate cohesive and HR > 1.4 are expressed as high cohesive group (Hausner, 1967). Flowability of powders with CI under 15 are classified as very good; CI between 15 and 20 as good; CI between 20 and 35 as fair; CI between 35 and 45 bad and CI over 45 as very bad (Carr, 1965).

### Color analysis

CIE *L* *, *a* *, *b* * values of eggshell powders were determined by using Konika Minolta CR5 Chromameter (Japan) at D 65 light source (Ho et al., 2013). At least five parallel readings were averaged.

### Direct Compression of Tablets

ESP of different particle sizes were directly compressed using a single-punch tablet pres (Renas Machine, Turkey). Tablet weight was arranged as 2.00 ± 0.2 g. At least 20 tablets were compressed from every particle size and replication for average weight, thickness and hardness determination.

### Tablet Analysis

### Thickness and Weight of Tablets

Average thickness and weight of the tablets were determined according to Bushra et al. (2008). 20 tablets were weighed individually using analytical balance and the average tablet weight was calculated. Thickness of 20 individual tablets was measured with an electronic caliper and the average tablet thickness were determined.

### Hardness

Hardness of the tablets was determined using a Texture Analyzer (TA-XT Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems, Godalming, England) equipped with a 30 kg load cell. Tablets were placed in a vertical position under a 25 mm cylinder probe and were compressed for 1 mm long at a speed of 0.03 mm/s. The maximum force (g force) at the moment of breaking of the tablet refers to the tablet hardness. The analysis was performed on 20 tablets and the average tablet hardness was determined.

### Statistical Analysis

Eggshell powders and tablet production was performed in three replications. Effect of particle size on the physical and tablet properties of eggshell powders were determined using SPSS version 20 (SPSS Inc. Chicago, Illinois) statistical analysis package program, one way Anova. Duncan Multiple Comparison Test was used to determine differences between the mean values at0.05 significance level (SPSS, 2010).

## RESULTS and DISCUSSION

### Eggshell Powder Properties

### Bulked and Tapped Density

Parameters such as bulk density, tapped density, angle of repose, Hausner Ratio and Carr Index are decisive criteria for the flow properties of powders (Kotadiya et al., 2008). Bulk and tapped density index of ESP were given in Table 1. The effect of particle size on bulk density of ESP was found statistically significant ($p < 0.0001$). In this study, the highest bulk density was determined in eggshell powders with a particle size of <500 µm. It was observed that the lowest bulk density was determined in powders below 355µm. One of the most important factors affecting the bulk density and flow properties of a powder is inter granular interaction. Powder properties and optimum water reduce the cohesiveness of the powder, increasing bulk density and flowability (Korhonen et al., 2002). Small size particles stick more tightly together. Therefore,

they occupy small volume and their bulk density is high (Vasilenko et al., 2013). Savlak et al. (2016) investigated effect of particle size on physical properties of unripe banana pulp flour and found that the particles under 212 µm had the highest tapped and the bulk density. However, they found that bulk and tapped density increased in the particle size range of 212-700 µm. Subba and Katawal (2013) stated that the bulk density of rice flour was higher in the particle range of 359 - 746 µm. The effect of particle size on tapped density of ESP was found statistically significant ($p < 0.0001$). Similar to bulk density, particles under 500 µm had the highest tapped density. Particles in the range of 355 – 500 µm had the lowest tapped density.

**Table 1.** Bulk Density ($\rho_{bulk}$), Tapped Density ($\rho_{tapped}$), Carr Index (CI) and Hausner Ratio (HR) of eggshell powder (ESP) for different particle size distributions

| Particle size of ESP (µm) | $\rho_{bulk}$ (g/mL) | $\rho_{tapped}$ (g/mL) | CI (%) | HR |
|---|---|---|---|---|
| <355 | $1.22 \pm 0.008^{b}$ | $1.49 \pm 0.023^{b}$ | $18.49 \pm 0.395^{a}$ | $1.23 \pm 0.009^{a}$ |
| 355-500 | $1.25 \pm 0.010^{b}$ | $1.35 \pm 0.020^{c}$ | $8.78 \pm 0.798^{b}$ | $1.10 \pm 0.013^{c}$ |
| <500 | $1.37 \pm 0.017^{a}$ | $1.60 \pm 0.019^{a}$ | $19.46 \pm 1.421^{a}$ | $1.16 \pm 0.024^{b}$ |
| p value | < 0.0001 | < 0.0001 | < 0.0001 | < 0.0001 |

Means with different letter in a column are statistically different from each other ($p < 0.05$).

**Carr Index (flowability) and Hausner Ratio (cohesiveness)**

Powders that show high compressibility and good flow properties are of great importance in tablet compression stage. The surface area of the powders increases in the compaction process (Badawy et al., 2000). Hausner ratio and compressibility index are very much preferred in determining powder flow properties since they can be applied economically and easily. These properties are calculated by using the bulk and tapped density of powders. Feature values such as uniformity of weight, uniformity of content, drug content, hardness or crushing strength, disintegration time, friability, tensile strength and dissolution time give us an idea of the compressibility of the tablets (Ofori-Kwakye et al., 2010).

Carr index (flowability) and Hausner ratio (cohesiveness) were given in Table 1. The effect of particle size on CI and HR of ESP was found statistically significant ($p < 0.0001$). The highest CI value was observed in the fractions between 355-500 µm with an average of 8.78. This value is < 15 and is in the class of powders with very good flow characteristics. CI values in other particle sizes (< 355 µm and < 500 µm) were 18.49 and 19.46, respectively. These results are between 15 and 20 and are in the class of powders that show good flow. The HR values showed a linear trend with CI. ESP between 355 - 500 µm had a HR under 1.20 which was low adhesive. It was concluded that all particle sizes were acceptable for tablet pressing. Powder with small particle sizes are more cohesive and show poor flow properties, which means transport problems etc. Fitzpatrick (2004) explained the relationship between poor flow characteristics and small particle size with large surface area per unit powder mass. As a result, eggshell powders investigated in the present study were not very small particle sized and showed good flow properties. Zea et al. (2013) investigated compressibility and dissolution properties of tablets made from pitaya (85 µm) and guava (158 µm) fruit powders and stated that the particle size did not affect flowability but increased HR and CI values with increasing particle size. In that study, the reason flowability was not affected may be because the particle size was very small. Dozan et al. (2014) worked with different particle sizes to determine sugar flow properties. In their study, they reported that sugar fractions containing smaller particles (< 100 µm) showed higher HR values (1.32 - 1.33) while HR ranged from 1.0 to 1.1 in larger sizes (> 100 µm) and powders could freely flow. In the present study, it was concluded that all particle sizes were acceptable for tablet compression.

**Color Profile**

*L** values of ESP were significant for all particle sizes and were shown in Table 2. *L** value increased with increasing particle size and all the size fractions were different from each other statistically ($p < 0.0001$).

The *L** value was highest in particle size under 500 µm with an average of 86.64. The high *L**value is associated with more reflection on the surface. Results of color analysis showed that there were significant differences in *a** values and *b** values of all size fractions. It was observed that *a** and *b** values decreased inversely with *L** value. The highest *a** ( 1.73) and b* (11.22) value were observed in ESP between 355 - 500 µm and it was different from other eggshell powders statistically ($p < 0.0001$). Generally, ESP from all particle sizes were cream colored.

**Table 2.** Color profile of eggshell powder (ESP) having different particle size distributions.

| Particle size of ESP (µm) | *L** | *a** | *b** |
|---|---|---|---|
| < 355 | 86.38 ± 0.047[b] | 1.61 ± 0.058 [b] | 10.70 ± 0.035 [b] |
| 355-500 | 86.02 ± 0.110[c] | 1.73 ± 0.025 [a] | 11.22 ± 0.106 [a] |
| < 500 | 86.64 ± 0.110[a] | 1.55 ± 0.035 [c] | 10.57 ± 0.343 [b] |
| p value | < 0.0001 | < 0.0001 | < 0.0001 |

Means with different letter in a column are statistically different from each other ($p < 0.05$).

**Eggshell Tablet Properties**

**Tablet Thickness and Weight**

Thickness and weight of the tablets obtained by direct compression of ESP were given in Table 3. Particle size fractions affected tablet weight and thickness statistically ($p < 0.0001$). Thickness and weight increased with the increase in particle size. Since the particles were homogeneously distributed, no significant differences were observed between them. During the compaction of the tablets, the small sized powders fill the tablet machine's chamber homogeneously and the large size powder cannot provide homogeneous filling. This causes the size, hardness, and dispersion times of tablets to differ (Fonner et al., 1966a, b).Van Veen et al. (2000) stated that tablets with high density were difficult to compress due to their strong inter particle bonds. In our study, the lowest bulk density powders and the lowest tablet thickness were observed in the size of particles below 355 µm. Similar to the statement of Van Veen et al. (2000), tablets obtained from larger particles with higher bulk density (355 – 500 µm and < 500 µm) were more difficult to compress, so their thickness was high (7.98 mm, 8.16 mm respectively). Tablet weight decreased with decreasing particle size. In line with our findings, it has been reported that as the powder size decreased by approximately 400 - 800 µm, the change in tablet weights decreased in direct proportion (Fonner et al., 1966a, b).

**Table 3.** Thickness, weight and hardness of eggshell powder (ESP) having differen tparticle size distributions

| Particle size of ESP (µm) | Whickness (mm) | Weight (g) | Hardness (g force) |
|---|---|---|---|
| < 355 | 7.25 ± 0.153 [b] | 1.82 ± 0.061 [b] | 1353.33 ± 310.054 [b] |
| 355-500 | 7.98 ± 0.083 [a] | 2.22 ± 0.0346 [a] | 11506.67 ± 837.038 [a] |
| < 500 | 8.16 ± 0.041[a] | 2.27 ± 0.025 [a] | 12866.67 ± 2203.028 [a] |
| p value | < 0.0001 | < 0.0001 | < 0.0001 |

Means with different letter in a column are statistically different from each other ($p < 0.05$).

Figures 1, 2 and 3 show tablets directly compressed from ESP with different particle sizes (< 355 µm, 355 – 500 µm, < 500 µm).



**Figure 1.** Tablets from 355 – 500 µm ESP



**Figure 2.** Tablets from < 500 µm ESP



**Figure 3.** Tablets from < 355 µm ESP

### Tablet Hardness

Tablet hardness values were given in Table 3. All the size fractions were different from each other statistically ($p < 0.0001$) and the effect of particle size on tablet hardness was statistically significant ($p < 0.0001$). The highest average hardness value was determined as 12,866.67 g force in ESP under 500 µm. However, particles in the range of 355 – 500 µm and under 500 µm were not statistically different ($p > 0.05$). Particles under 355 µm had very low tablet hardness showing that they were not suitable for direct compression of eggshells.

## CONCLUSION

Waste management of eggshell powders was successfully accomplished by using as a Ca source for human consumption. Particle size affected powder and tablet properties of eggshells. Tablet weight, thickness and hardness increased with increasing particle size. Eggshell powders from all particle sizes had good flowability. However, eggshell powders between 355 – 500 µm and under 500 µm was the most suitable particle size in terms of tablet hardness. Eggshell particle sizes under 355 µm were not suitable for tablet compression. Further studies related to utilization of chemically processed eggshell powder for human consumption as well as bioaccessability of Ca in eggshell are of value.

## REFERENCES

Badawy, S. I. F., Menning, M. M., Gorko, M. A., & Gilbert, D. L. (2000). Effect of process parameters on compressibility of granulation manufactured in a high-shear mixer. *International journal of pharmaceutics*, *198*(1), 51-61.

Bushra, R., Shoaib, M. H., Aslam, N., Hashmat, D., & Rehman, M(2008). Formulation development and optimization of ibuprofen tablets by direct compression method. *Pak. J. Pharm. Sci*, *21*(2), 113-120.

Carr, R. L., Carr, R. L., Carr, R. I., & Carr, R. (1965). Evaluating flow properties of solids.

Barbara, D., Marta, J., Beata, S. M., & Florian, R. (2016). Use of eggshells as a raw material for production of calcium preparations. *Czech Journal of Food Sciences*, *34*(4), 313-317.

Dozan, T., Benković, M., & Bauman, I. (2014). Sucrose particle size reduction-determination of critical particle diameters causing flowability difficulties. *J Hyg Eng Des*, *8*, 3-10.

Fina, B. L., Brun, L. R., & Rigalli, A. (2016). Increase of calcium and reduction of lactose concentration in milk by treatment with kefir grains and eggshell. *International journal of food sciences and nutrition*, *67*(2), 133-140.

Fitzpatrick, J. J., Iqbal, T., Delaney, C., Twomey, T., & Keogh, M. K. (2004). Effect of powder properties and storage conditions on the flowability of milk powders with different fat contents. *Journal of food Engineering*, *64*(4), 435-444.

Fonner Jr, D. E., Banker, G. S., & Swarbrick, J. (1966). Micromeritics of granular pharmaceutical solids II. Factors involved in the sieving of pharmaceutical granules. *Journal of pharmaceutical sciences*, *55*(6), 576-580.

Fonner Jr, D. E., Banker, G. S., & Swarbrick, J. (1966). Micromeritics of granular pharmaceutical solids i: Physical properties of particles prepared by five different granulation methods. *Journal of pharmaceutical sciences*, *55*(2), 181-186.

Gallo, L., Llabot, J. M., Allemandi, D., Bucalá, V., & Piña, J. (2011). Influence of spray-drying operating conditions on Rhamnus purshiana (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technology*, *208*(1), 205-214.

Gaonkar, M., & Chakraborty, A. P. (2016). Application of eggshell as fertilizer and calcium supplement tablet. *International journal of innovative research in science, engineering and technology*, *5*(3), 3520-3525.

Gonnissen, Y., Remon, J. P., & Vervaet, C. (2007). Development of directly compressible powders via co- spray drying. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, *67*(1), 220-226.

Hassan, N. M. (2015). Chicken eggshell powder as dietary calcium source in biscuits. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, *10*, 199-206.

Hausner, H. H. (1967). *Friction conditions in a mass of metal powder*. Polytechnic Inst. of Brooklyn. Univ. of California, Los Angeles.

Ho, L. H., Aziz, N. A. A., & Azahari, B. (2013). Physico-chemical characteristics and sensory evaluation of wheat bread partially substituted with banana (Musa acuminata X balbisiana cv. Awak) pseudo-stem flour. *Food Chemistry*, *139*(1-4), 532-539..

Jinapong, N., Suphantharika, M., & Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, *84*(2), 194-205.

Korhonen, O., Pohja, S., Peltonen, S., Suihko, E., Vidgren, M., Paronen, P., & Ketolainen, J. (2002). Effects of physical properties for starch acetate powders on tableting. *AAPS PharmSciTech*, *3*(4), 68-76.

Kotadiya, R., Patel, V., & Patel, H. (2008). Comparative evaluation study of matrix properties of natural gums and semi-synthetic polymer. *J Pharm Res*, *1*(2), 208-214.

Lee, Y. K., Kim, A. Y., Min, S. G., & Kwak, H. S. (2016). Characteristics of milk tablets supplemented with nanopowdered eggshell or oyster shell. *International Journal of Dairy Technology*, *69*(3), 337-345.

Ofori-Kwakye, K., Osei-Yeboah, F., & Kipo, S. L. (2010). Formulation and quality evaluation of two conventional release tablet formulations. *Int. J. Pharm. Sci. Review and Research*, *4*(1), 94-99.

Peacock, M. (2010). Calcium metabolism in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *5*(Supplement 1), S23-S30.

Render, D., Samuel, T., King, H., Vig, M., Jeelani, S., Babu, R. J., & Rangari, V. (2016). Biomaterial-derived calcium carbonate nanoparticles for enteric drug delivery. *Journal of nanomaterials*, *2016*.

Savlak, N., Türker, B., & Yeşilkanat, N. (2016). Effects of particle size distribution on some physical, chemical and functional properties of unripe banana flour. *Food chemistry*, *213*, 180-186.SPSS, I. (2010).

SPSS for windows (version 20). *Chicago, Ill, USA*.

Subba, D., & Katawal, S. B. (2013). Effect of particle size of rice flour on physical and sensory properties of Sel-roti. *Journal of food science and technology*, *50*(1), 181-185.

Van Veen, B., Van der Voort Maarschalk, K., Bolhuis, G. K., Zuurman, K., & Frijlink, H. W. (2000). Tensile strength of tablets containing two materials with a different compaction behaviour. *International journal of pharmaceutics*, *203*(1-2), 71-79.

Vasilenko, A., Koynov, S., Glasser, B. J., & Muzzio, F. J. (2013). Role of consolidation state in the measurement of bulk density and cohesion. *Powder technology*, *239*, 366-373.

Zaman, M., Adnan, S., Saeed, M. A., Farooq, M., Masood, Z., Chishti, S. A., ... & Khan, R. S. (2013). Formulation and in-vitro evaluation of sustained release matrix tablets of cellulose based hydrophilic and hydrophobic polymers loaded with loxoprofen sodium. *Indo American J Pharma Res*, *3*, 7389-98.

Zea, L. P., Yusof, Y. A., Aziz, M. G., Ling, C. N., & Amin, N. A. M. (2013). Compressibility and dissolution characteristics of mixed fruit tablets made from guava and pitaya fruit powders. *Powder technology*, *247*, 112-119.

# The antioxidant status of fruit extracts of *Prunus laurocerasus* under oxidative damage $H_2O_2$-induced on human lymphocyte culture

Çınar SEVERCAN[1*]

[*1]Zonguldak Bülent Ecevit University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Zonguldak, Turkey

* Corresponding author e-mail: cinarsevercan@gmail.com

*Prunus laurocerasus,* also known as taflan or karayemiş, is particularly cultivated for its fruit in the Black Sea region. *Prunus laurocerasus* has been used for treatment such as eczema, sore throat, asthma, coughs, stomach ache, and hemorrhoids. Recent studies also have been indicated that its fruit is beneficial in order to reduce blood glucose. Although, there are a few studies to reveal antioxidant effect of *Prunus laurocerasus,* its antioxidant effect on living cell is unknown. For this reason, we investigated antioxidant effect under oxidative damage 50 µM $H_2O_2$ induced on human lymphocyte culture. The cells were administrated 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml taflan, 800 µg/ml doses of methanol extract concentration of *Prunus laurocerasus'* fruit for 24h and 48h. Negative (no administrated) and positive control cell cultures (only 50 µM $H_2O_2$-induced) were formed. After 48h, the homogenates of cultured human lymphocyte obtained and total antioxidant status (TAS) was measured using Elisa methods. 24h and 48h administration of methanol extract of *Prunus laurocerasus'* fruit caused significantly increase in serum TAS levels at all doses groups compare to only $H_2O_2$-induced group. This result has revealed that *Prunus laurocerasus* has antioxidant effect against oxidative damage on human lymphocyte culture.

**Key words:** *Prunus laurocerasus,* total antioxidant status, hydrogen peroxide, human lymphocyte

## INTRODUCTION

*Laurocerasus officinalis Roem. (Prunus laurocerasus)* belongs to Rosacea family, Rrunoideae subfamily and Prunus genus. The plant called as a taflan or karayemiş and is commonly consumed in Black Sea region of Turkey and also grows in Balkans, Western Europe, Iran and Mediterranean countries. It has beneficial content of nutrients such as glucose, fructose, sorbitol, xylose, arabinose, carotenoid, ascorbic acid, fiber, protein, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, potassium, magnesium and calcium (Vahapoglu et al., 2018).

A study reported that this plant increase the insulin level and regulate the blood glucose level (Turan et al., 2013). Another study revealed to be useful for patients both with hypoglycemia and hyperglycemia (Senaylı et al., 2012).

*P. laurocerasus* has also antoxidant effect due to content of rich phenolic component (Kolaylı et al., 2003). However, there is no study indicating antioxidant effect on living cell in literature. Therefore, the aim of this study was to analyse the antioxidant effect on human lymphocyte culture.

## MATERIALS AND METHODS

4 ml peripheral blood was taken from 4 non-smoker healthy individuals (average of ages: 21). The blood was dissolved with 0.5 ml heparin.

### Plant Material

The fruits of *P. laurocerasus* were picked from Zonguldak in August of 2019. These were sundried and powdered using a blender.

### Soxhlet extraction

*P. laurocerasus'* fruits weighed 40 grams were extracted with 400 ml methanol by the Soxhlet apparatus for a period of 18 extraction cycles (Karabegovic et al., 2014). The next step, the methanol evaporated using rotary evaporator machine. Subsequently, the filtrates lyophilized. The lyophilisates were dissolved with methanol and 500 mg/ml extract solution was prepared.

**Pilot study**

For assessment LD50 and oxidative dose of $H_2O_2$ and fruit extract, 0.2mL peripheral blood was added to 3 mL chromosome medium. Then, the lymphocytes culture incubated at 37 $^0$C at 72 h using the protocol (Timocin and et al., 2016; Norizadeh Tazehkand and et al., 2016). The culture exposed 6 different dose of $H_2O_2$ (1 µM, 5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) and fruit extract (100, 200, 300, 600, 800, 1200 µg/µl) for 24h. After 2000 rpm for 10 minutes, the lymphocytes cultures exposed to hypotonic solution (0.4 % KCL) and were fixed three times with cold fixative solution (1 volume acetic acid / 3 volume methanol). After fixation process, the cells were centrifuged at 1200 rpm for 15 min. The lymphocytes cells were dropped on cold glass slides and dried. Then, glass slides stained with 5% Giemsa. Approximately, 1000 cells examined under the microscope for determination metaphase for mitotik index (MI) analysis. The LD50 dose of $H_2O_2$ was determined 80 µM. The oxidative dose of $H_2O_2$ was measured by ELISA methods and was determined as 50 µM doses. However, the LD50 of fruit extract was not determined because of that there was no toxic effect at all of doses in MI analysis. Unlike this, except for 1200 µg/µl dose of extract, the total antioxidant status level significantly increased compare to control group. Therefore, it was chosen 800 µg/µl doses of extract for highest.

**Cell Culture and Biochemical Analysis**

0.2mL peripheral blood was added to 3 mL chromosome medium. Then, the lymphocytes culture incubated at 37 $^0$C at 72 h. 11 groups was set as follows:

**Group 1 (Control group):** No administration

**Group 2 (Positive control group):** The group administered only 50 µM $H_2O_2$ for 24h.

**Group 3:** The group administered 50 µM $H_2O_2$ +100 µg/µl extract for 24h.

**Group 4:** The group administered 50 µM $H_2O_2$ + 200 µg/µl extract for 24h.

**Group 5:** The group administered 50 µM $H_2O_2$ + 400 µg/µl extract for 24h.

**Group 6:** The group administered 50 µM $H_2O_2$ + 800 µg/µl extract for 24h.

**Group 7 (Positive control group):** The group administered only 50 µM $H_2O_2$ for 48h.

**Group 8:** The group administered 50 µM $H_2O_2$ +100 µg/µl extract for 48h.

**Group 9:** The group administered 50 µM $H_2O_2$ + 200 µg/µl extract for 48h.

**Group 10:** The group administered 50 µM $H_2O_2$ + 400 µg/µl extract for 48h.

**Group 11:** The group administered 50 µM $H_2O_2$ + 800 µg/µl extract for 48h.

After 72h incubation, the cells were centrifuged 2000 rpm for 10 minutes. Subsequently, the cells homogenates were prepared at a 1:10 (w:v) dilution in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. Then, the cells centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C (Agar and et al., 2011). Supernatants collected and stored at 80 $^0$C. TAS levels were measured using commercially available kits (Relassay, Turkey).

**Data analysis**

SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 25.0 was used for analysis. Kruskal-Wallis test was used to determine whether there was a significance differences among the 6 groups. p value $\leq 0.05$ was accepted as statistically significant and the Mann-Whitney U test with was used to determine statistical differences between two groups. In all statistical analyses, the significance level was accepted as $p \leq 0.05$.

**RESULTS and DISCUSION**

Studies indicated that plants containing phenolic compounds have antioxidant activity, antihyperglycemia, antihypertensive and anticancer effect (Ranilla et al., 2010; Moo-Huchin et al., 2015, Demir et al., 2017).

An important part of the antioxidant activity of *P. laurocerasus* originates from phenolic compounds (Kolaylı et al., 2003). Karabegovic et al. (2014) identified that highest amount of phenolic and flavonoid compounds of *P. laurocerasus* and they showed that these compounds demonstrated the best antioxidant activity.

According to this study result, there was no significant change between group 1 (control group) and group 2 (positive control, 24 hours $H_2O_2$ exposure) whereas a significant decrease was found group 7 (positive control, 48 hours $H_2O_2$ exposure) compare to group 1 (Table 1).

Against to oxidative damage $H_2O_2$-induced, significant increases of TAS levels were found in 24 h exposing fruit extract doses groups (group3, group 4, group 5, group 6) compare to group 1. On the other side, there was no significant change group 8 (100 µg/µl doses of fruit extract) and group 9 (200 µg/µl doses of fruit extract). However, TAS levels of group 10 (400 µg/µl doses of fruit extract) and group 11 (800 µg/µl doses of fruit extract) significantly increased compare to group 1 (Table 1).

Against to oxidative damage $H_2O_2$-induced, there were significant increases in TAS levels of dose groups exposed to fruit extract for 24 hours compared to group 2. Similarly, TAS levels of dose groups exposed to 48 h fruit extract doses groups significantly increased compare to group 7.

There was no significant change in comparing groups exposed to hydrogen peroxide and fruit extract for 24 hours and 48 hours of the same dose groups (Table 1).

**Table 1: TAS median levels of all groups and significant difference**

| Groups (n=4) | Exposing time | TAS median levels (mmol/L) |
|---|---|---|
| Group 1 (Control group), No administration | none | 1. 39 |
| Group 2 (positive control) 50 µM $H_2O_2$ | 24 hours | 1.25 |
| Group 3 50 µM $H_2O_2$ +100 µg/µl extract | 24 hours | 1.67 [a,b] |
| Group 4 50 µM $H_2O_2$ + 200 µg/µl extract | 24 hours | 1.68 [a,b] |
| Group 5 50 µM $H_2O_2$ + 400 µg/µl extract | 24 hours | 1.7 [a,b] |
| Group 6 50 µM $H_2O_2$ + 800 µg/µl extract | 24 hours | 1.78 [a,b] |
| Group 7 (positive control) 50 µM $H_2O_2$ | 48 hours | 1.2 [a] |
| Group 8 50 µM $H_2O_2$ +100 µg/µl extract | 48 hours | 1.46 [c] |
| Group 9 50 µM $H_2O_2$ + 200 µg/µl extract | 48 hours | 1.52 [c] |
| Group 10 50 µM $H_2O_2$ + 400 µg/µl extract | 48 hours | 1.76 [a,c] |
| Group 11 50 µM $H_2O_2$ + 800 µg/µl extract | 48 hours | 1.75 [a, c] |

n:number of animals, [a] a significant difference compare to Group 1 at $p \leq 0.05$, [b] a significant difference compare to Group 2 at $p \leq 0.05$, [c] a significant difference Group 7 at $p \leq 0.05$ , [d] a significant difference between same dose groups at $p \leq 0.05$.

## CONCLUSION

Our result indicated that methanol extract of *P. laurocerasus'* fruit has excellent antioxidant activity against to oxidative damage $H_2O_2$-induced on human lymphocyte culture. We are planning to design experimental animal model in order to determine this antioxidant activity in the future.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was accepted by Zonguldak Bulent Ecevit University (ZBEU) Board of Local Ethics and was financially supported by ZBEU Coordinator of Scientific Research Projects under code number 2019-43085703-02.

## REFERENCES

Agar G, Aslan A, Kotan Sarioglu E, Alpsoy L, Çeker S 2011. Protective activity of the methanol extract of Usnea longissima against oxidative damage and genotoxicity caused by afl atoxin B1 in vitro. Turkish Journal of Medical Sciences, 41 (6): 1043-1049.

Demir S, Turan I, Demir F, Ayazoglu Demir E, Aliyazıcıoglu Y 2017. Cytotoxic Effect of Laurocerasus officinalis Extract on Human Cancer Cell Lines. Marmara Pharmaceutical Journal 21: 121-126.

Kolayli S, Küçük M, Duran C, Candan F, Dinçer B 2003. Chemical and antioxidant properties of Laurocerasus officinalis Roem. (cherry laurel) fruit grown in the Black Sea region. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(25): 7489-7494.

Moo-Huchin VM, Moo-Huchin MI, Estrada-León RJ, Cuevas-Glory L, Estrada-Mota IA, Ortiz-Vázquez E, Betancur-Ancona D, Sauri-Duch E 2015. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. Food chemistry, 166:17-22.

Norizadeh Tazehkand M, Topaktas M, Yilmaz MB 2016. Assessment of chromosomal aberration in the bone marrow cells of Swiss Albino mice treated by 4-methylimidazole. Drug and Chemical Toxicology, 39(3):307-311.

Orhan I, Aydin A, Colkesen A, Sener B, Isimer AI 2003. Free radical scavenging activities of some edible fruit seeds. Pharmaceutical Biology, 41(3): 163-165.

Ranilla LG, Kwon Y, Apostolidis E, Shetty K 2010. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. Bioresource Technology 101: 4676–4689.

Senaylı A, Sahin A, Şenaylı Y, Elmastas M 2012. Evaluation the Anti-Diabetic Activity of Cherry Laurel (Laurocerasus officinalis). The Open Conference Proceedings Journal, 3: 8-12.

Timocin T, Ila HB, Dordu T, Husunet MT, Tazehkand MN, Valipour E, Topaktas M 2016. Assessment of in vitro genotoxic and cytotoxic effects of flurbiprofen on human cultured lymphocytes. Drug and Chemical Toxicology, 39(3):338-34.

Turan MI, Turkoglu M, Dundar C, Celik N, Suleyman H 2013. Investigating the Effect of *Prunus laurocerasus* Fruit Extract in Type II Diabetes Induced Rats. International Journal of Pharmacology, 9: 373-378.

Vahapoglu B, Altan EN, Gülseren I 2018. A review on bioactive properties of cherry laurel and its potential utilization in functional foods. The journal of food, 43 (5): 751-764

# Treatment of tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) from wastewater with advanced treatment methods

Fadime Karaer Özmen [1*], Ali Savaş Koparal [2]

[*1]Environmental Engineering Department, Engineering Faculty, Eskisehir Technical University, Iki Eylül Campus, 26555, Eskisehir, Turkey
[2]Health Programs Department, Open Education Faculty, Anadolu University, Yunus Emre Campus, 26470, Eskisehir, Turkey

*Corresponding author e-mail: fadimek@eskisehir.edu.tr

**Abstract**

Phosphorus-based flame retardant (FR) chemicals usage has increased in worldwide recently. Tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP), which is listed as organophosphated FR, is mainly used in the production of liquid unsaturated polyester resins, epoxy resin, and cellulose ester compounds. TCEP is not readily biodegradable, and it is defined as persistent, bio-accumulative and toxic pollutant. It was estimated that 98.6% of the TCEP remains in the water and 1.4% of the TCEP is adsorbed to the sludge because of high water solubility. It is difficult to remove the organic compounds, which are resistant to biological treatment by conventional wastewater treatment methods like TCEP. Therefore, advanced oxidation processes (AOPs) have become alternative method providing high efficiency to reduce these organic pollutants. Advanced oxidation processes (AOPs) can convert toxic and persistent organic matter into harmless end products. AOPs is usually performed with hydrogen peroxide ($H_2O_2$) or ozone ($O_3$), catalysts (iron ions, electrodes, metal oxides) and UV irradiation. AOPs involve the combination of strong oxidizing agents (hydrogen peroxide-$H_2O_2$ or ozone-$O_3$, catalysts such as iron ions, electrodes, metal oxides), UV light, sunlight, ultrasound, and their sequence and hybrid applications.

In this study, the treatment of tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) was investigated by advanced treatment methods from water and wastewater. Photolysis (UV), Sonolysis (US), Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV), Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) advanced oxidation process were examined and the toxicity of these AOPs were evaluated for TCEP removal from wastewater. The removal efficiencies of used AOPs were determined with total organic carbon (TOC) analyses identifying TCEP. As a result of the treatment studies, 99.5 % TOC removal was achieved by the treatment of TCEP with Sono-Photo-Fenton process, while the cytotoxicity of water was significantly reduced.

**Keywords:** Fenton, Sonolysis, Photolysis, Sono-Fenton, Sono-Photo-Fenton, tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP)

## INTRODUCTION

Pollutants in water and wastewater have a wide range of negative impacts on the environmental and human health. Since the early 1970s, the use of halogenated flame-retardant additives in the plastics related industries has been increasing day by day. Lots of brominated flame retardants banned in developed countries while they are still in use in developing countries. The flame-retardant additives threaten human health due to water, soil and air pollution at end of their usage. Also, flame retardant additives are frequently encountered as a problem in wastewater treatment plants (Posner, 2009). Even though some flame retardant is introduced as environmentally friendly, many researchers have started to investigate the toxic effects of these additives on environmental systems. In particularly, the use of organophosphated and chlorinated flame-retardant additives has increased for last decade because brominated flame-retardant additives banned due to their carcinogenic effects on human (Van der Veen and Boer, 2012).

Flame retardant or flame-retardant products aim to make the ignition difficult and prevent the spread of flame to save human from fire (Innes, A. and J. Innes, 2011). Textile materials easily ignite during the fire and cause the fire to grow. Therefore, the effort to ensure the safety of human life has made it compulsory to use flame retardant chemicals. Many of these chemicals used in textile have serious impacts on the environment and public health. The areas of use of flame-retardant textiles can be listed as houses (clothes, pajamas, bed

linen, blankets, upholstery fabrics, carpets and curtains), offices, public buildings, areas for transportation purposes (pilot clothes, tent cloths, parachutes, seat covers for vehicles such as airplanes, cars, trains, etc.), work places (related fire like industrial technician and fireman clothes) in many areas. Halogenated flame-retardant chemicals includes VII. group elements in periodic table (F-, Cl-, Br- and I-) and they improve the flame resistance of textile enormously (Shaw, 2010). They has been used since the 1930s for reasons such as cost-effectiveness and applicability to lots of polymer. They are most effective groups of flame-retardant chemicals and they affect in gas phase on fire (Horrocks and Price, 2001). They raise the formation of smoke during combustion and lead to the formation of corrosive -toxic gases such as HCl and HBr. They are extremely toxic on environmental and human health. It causes cancer in humans, hormonal disorders, neurotoxicity and effects on reproductive systems. They are also observed in f in the aquatic environment (Knudsen et al., 215).

Organophosphated (OP) compounds have replaced brominated flame retardants (BFRs) due to their technical properties and have been widely used worldwide in recent years. OPs are widely used as flame retardants, plasticizers and antifoam agents in a variety of industries including plastics, furniture, textiles, electronics, construction, vehicles and petroleum industries. Mostly used OPs are Tris (2-kloroetil) phosphate (TCEP), Tris (2-kloroizopropil) phosphate (TCIPP), Tris (l, 3-dikloro-2-propil) phosphate (TDCPP), Tritely phosphate (TEP), Tripropil phosphate (TPP), Tri-n-butyl phosphate (TNBP), Tri-iso-butyl phosphate (TIBP), Trikresil phosphate (TMPP), Triphenyl phosphate (TPHP). TCEP is most used organophosphated flame retardant additives in lots of areas (Nass et al., 2002). TCEP is considered as non-biodegradable. It is seen that the almost 100 % of TCEP remains in water rather than sludge. In the treatment of wastewater, TCEP degradation rate is very low under aerobic and anaerobic conditions. TCEP was also detected in groundwater affected by rainwater, runoff and rainwater infiltration. They are transported with atmospheric conditions to water and soil environment Organophosphated flame retardants were also detected in the aquifer parts in ground water (Abdullah et al., 2019). Previous studies indicated that TCEP was found in domestic waste water, industrial waste water, drinking water, surface water (such as streams, rivers, lakes), groundwater, rain waters and dust samples taken from houses varying its concentration from ng/L to mg/L (Ren et al., 2008).

Within the scope of this study, trichloro ethyl phosphate (TCEP), which is frequently encountered in water /waste water treatment plants, was investigated for its treatability in Photolysis (UV, Sonolysis (US), Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV), Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) advanced oxidation process advanced water/wastewater methods. The study aims to increase removal efficiency of TCEP with these advanced methods when. the toxicity of these AOPs were evaluated for TCEP removal from wastewater.

## MATERIALS AND METHODS

1000 mg/L tris(2-chloroethyl) phosphate (Sigma Aldrich-TCEP-C6H12CI3O4P- MW:285.4898 g/mol, 97% purity) solution was used for treatment studies as model wastewater treatability in Photolysis (UV), Sonolysis (US), Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV), Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) process. The characteristic of this model wastewater was given in Table 1.

**Table 1:** Characteristic of model wastewater

| **Parameter** | Value |
|---|---|
| **COD (mg/L)** | ≈ 875 |
| **TOC (mg/L)** | ≈ 290 |
| **pH** | ≈ 8 |
| **Conductivity (µS/cm)** | ≈ 34.10 |

Photolysis (UV) studies were performed in UV reactor using UV-C lamp with 254 nm wavelength applying 8 watts power at room temperature. In a metal flow-controlled reactor with a length of 25 cm, an inner diameter of 2.5 cm and an outer diameter of 4 cm was used in UV treatment given in Figure 1. Time-dependent samples were taken under batch conditions from reactor. 400 ml model wastewater containing 1000 mg/L TCEP was treated in a recycled batch reactor operated at a flow rate of 25 ml/min during 60 minutes retention time.

Homogeneous Photolysis (UV-$H_2O_2$) treatment were studied in UV reactor given in Figure 1 using three different $H_2O_2$ (Merck, 35% w/w) concentrations. The $H_2O_2$ concentrations were adjusted as 1000 mg/L, 2000 mg/L, and 3000 mg/L $H_2O_2$ in model wastewater solution containing 1000 mg/L TCEP using suitable primary $H_2O_2$ stock solutions. During 60 min treatment period, the samples were collected from treated wastewater.

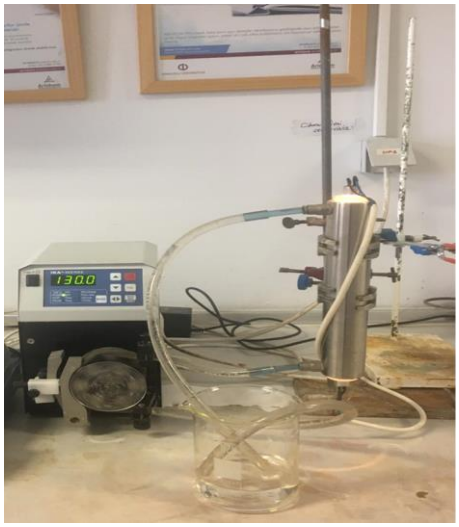


**Figure 19.** Photolysis treatment setup

Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) studies were conducted in reactor given in Figure 2 using three different $H_2O_2$ (Merck, 35% w/w) concentrations and six different $Fe^{+2}$ concentrations. The $FeCI_2.4H_2O$ (Merck, 99% w/w) was used as $Fe^{+2}$ source in Fenton treatment process. Firstly, The $H_2O_2$ concentrations were adjusted as 1000 mg/L in model wastewater solution containing 2 mg/L, 4 mg/L, 6 mg/L, 8 mg/L, 10 mg/L and 20mg/L $Fe^{+2}$ using suitable primary $FeCI_2.4H_2O$ stock solutions to determine the effect of $Fe^{+2}$ concentration. Secondly, $Fe^{+2}$ concentration was set to 20 mg/L in model wastewater differing $H_2O_2$ concentration to enhance removal efficiency of TCEP from waste water.

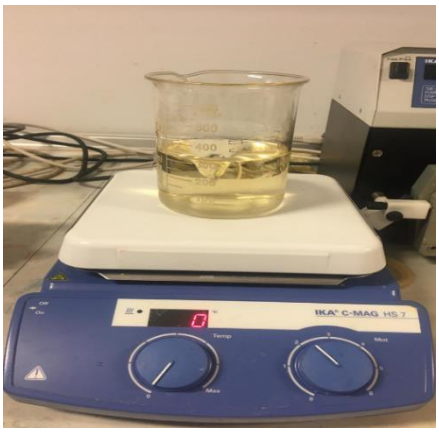



**Figure 2:** Fenton treatment setup

Sonolysis studies were carried out in a W-113 Ultrasonic multi-cleaner (Honda Electronics Co., Ltd., Aichi, Japan) given in Figure 3 using batch flow condition. This batch type of ultrasonic reactor was operated at ultrasonic frequencies of 28, 45 and 100 kHz and at a power of 100 W.




**Figure 3:** Batch type of ultrasonic reactor was operated at ultrasonic frequencies of 28 kHz, 45 kHz and 100 kHz

In the Photo-Fenton studies, (UV-$Fe^{+2}$-$H_2O_2$), Fenton treatments were performed in UV reactor given in Figure 1 applying same $Fe^{+2}$ and $H_2O_2$ concentrations. Sono-Fenton studies (US-$Fe^{+2}$-$H_2O_2$) treatments were performed in US reactor given in Figure 3 applying same $Fe^{+2}$ and $H_2O_2$ concentrations. During 60 min treatment period, the samples were collected from treated wastewater,

Time-dependent samples were taken under batch conditions from all treatment process and the removal efficiency of TCEP was evaluated with total organic carbon (TOC) equivalent. TOC value of all collected samples from treatment processes desired time interval were determined with TOC Analyzer (SHIMADZU, TOC-LCP and ASI-L)

The reaction kinetic of Photolysis (UV), Sonolysis (US), Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV), Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) advanced oxidation process were examined with first order reaction kinetic model.

$$reaction\ rate = \frac{dC}{dt} = kC \quad (1)$$

$$In\ (\frac{C_0}{C_t}) = kt \quad (2)$$

For the optimum treatment condition obtained in these AOPs, the cytotoxicity experiments were conducted with Microtox Test Procedure using *Vibrio fischeri* bacteria compering untreated model wastewater after the utilization of $H_2O_2$. The toxicity reduction was expressed as relative toxicity index (RTI) with lethal concentration required for 50% death of bacteria ($LC_{50}$) of un-treated and treated wastewater for each AOPs.

$$RTI = (\frac{LC_{50}\text{concentrations of untreated wastewater at t=0}}{LC_{50}\text{ concentrations of treated wastewater at t=t}}) \quad (3)$$

## RESULTS and DISCUSSION

The treatment results of Photolysis (UV), Sonolysis (US), Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV), Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) advanced oxidation process were examined in this section debating TOC removal and cytotoxicity reduction. The effects of Photolysis (UV), Sonolysis (US), Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV), Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) on TOC removal were summarized in Table 2 and the comparing removal trend of each AOP was illustrated in Figure 4 during the treatment period.

**Table 2:** The treatment efficiency of each AOPs

| Type of AOPs | Treatment Conditions | Effluent TOC concentration | TOC Removal Efficiency (%) |
|---|---|---|---|
| **Photolysis (UV)** | 254 nm UV-C 8 W | 233.0 | 19.00 |
| **Sonolysis (US)** | 28 kHz, 100 W | 243.2 | 15.78 |
| | 45 kHz, 100 W | 244.4 | 15.62 |
| | 100 kHz, 100 W | 245.3 | 14.93 |
| **Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$)** | 2 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 200.0 | 30.56 |
| | 4 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 175.1 | 39.24 |
| | 6 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 160.0 | 44.44 |
| | 8 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 133.3 | 53.82 |
| | 10 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 125.4 | 56.60 |
| | 20 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 118.1 | 59.03 |
| | 20 mg/L $Fe^{+2}$+ 2000 mg/L $H_2O_2$ | 40.0 | 86.11 |
| | 20 mg/L $Fe^{+2}$+ 3000 mg/L $H_2O_2$ | 20.0 | 93.06 |
| **Homogenous Photolysis (UV+ $H_2O_2$)** | UV+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 199.2 | 30.75 |
| | UV+ 2000 mg/L $H_2O_2$ | 107.0 | 62.85 |
| | UV+ 3000 mg/L $H_2O_2$ | 60.2 | 77.08 |
| **Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV)** | UV+10 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 10.0 | 96.53 |
| **Sono-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$)** | US28+10 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$ | 50.0 | 82.64 |
| **Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV)** | US28+10 mg/L $Fe^{+2}$+ 1000 mg/L $H_2O_2$+UV | 1.5 | 99.48 |

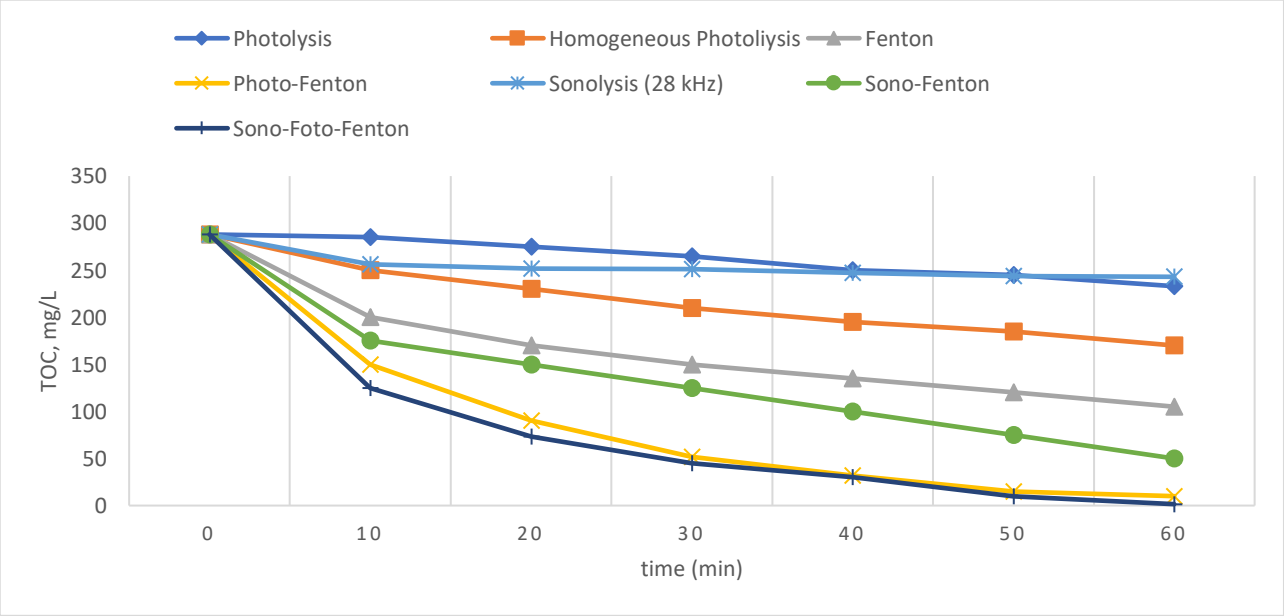



**Figure 4:** The comparison of advanced oxidation process efficiencies on TOC removal

In Table, while TOC removal efficiency was determined as 19.00 % in Photolysis (UV) treatment, in the Homogenous Photolysis (UV-$H_2O_2$) process, 30.75%, 62.85 % and 77.08% removal efficiencies were determined differing with 1000 mg/L, 2000 mg/L, and 3000 mg/L $H_2O_2$ concentration respectively. Similar to Photolysis (UV), TOC removal efficiency was found as nearly 20% in Sonolysis varying from 28 kHz to 100 kHz ultasonic frequency. While Like Fenton treatment ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) provided the 93.06 % TOC removal

efficiency with 20 mg/L $Fe^{+2}$and 3000 mg/L $H_2O_2$ concentration, Photo-Fenton (UV-$Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Sono-Fenton (US-$Fe^{+2}$-$H_2O_2$) succeeded higher TOC removal with 10 mg/L $Fe^{+2}$ and 1000 mg/L $H_2O_2$ concentration. As a result, the most important hesitation, which was the release high amount of $Fe^{+2}$, $Fe^{+3}$ and $H_2O_2$ chemicals into water body, about Fenton treatment in literature is eliminated with the hybrid Photo-Fenton (UV-$Fe^{+2}$-$H_2O_2$) treatment (Koparal, 2018; Watts and Linden, 2008). Even if the $H_2O_2$ can be depleted in water with sun light, the usage higher $H_2O_2$ dosage in water can cause more aggressive or reactive chemical species especially for high $CI^-$ containing wastewater, Also, the iron concentration cannot be higher than 0.3 mg/L in drinking water according to secondary rules of Environmental Protection Agency in addition to give taste to water if the Fe is found in water even with low concentration and (Hanson et al. 2015). Thus, the Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV), Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) processes can be used as more effective, environmental-friendly and health protecting method if the advanced oxidation process is required for special pollutant like TCEP can be found in water and wastewater at the point of reducing chemical (Ye et al. 2017). It was clearly stated the increasing effect of UV and US on reaction rate (Xu et al., 2017) and mass transfer rate for the Photo-Fenton (UV-$Fe^{+2}$-$H_2O_2$), Sono-Fenton ((UV-$Fe^{+2}$-$H_2O_2$), and Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) treatments in Figure 4, the reaction kinetic of these treatment methods were studied based TOC removal according to Pseudo first order kinetic giving in Figure 5.

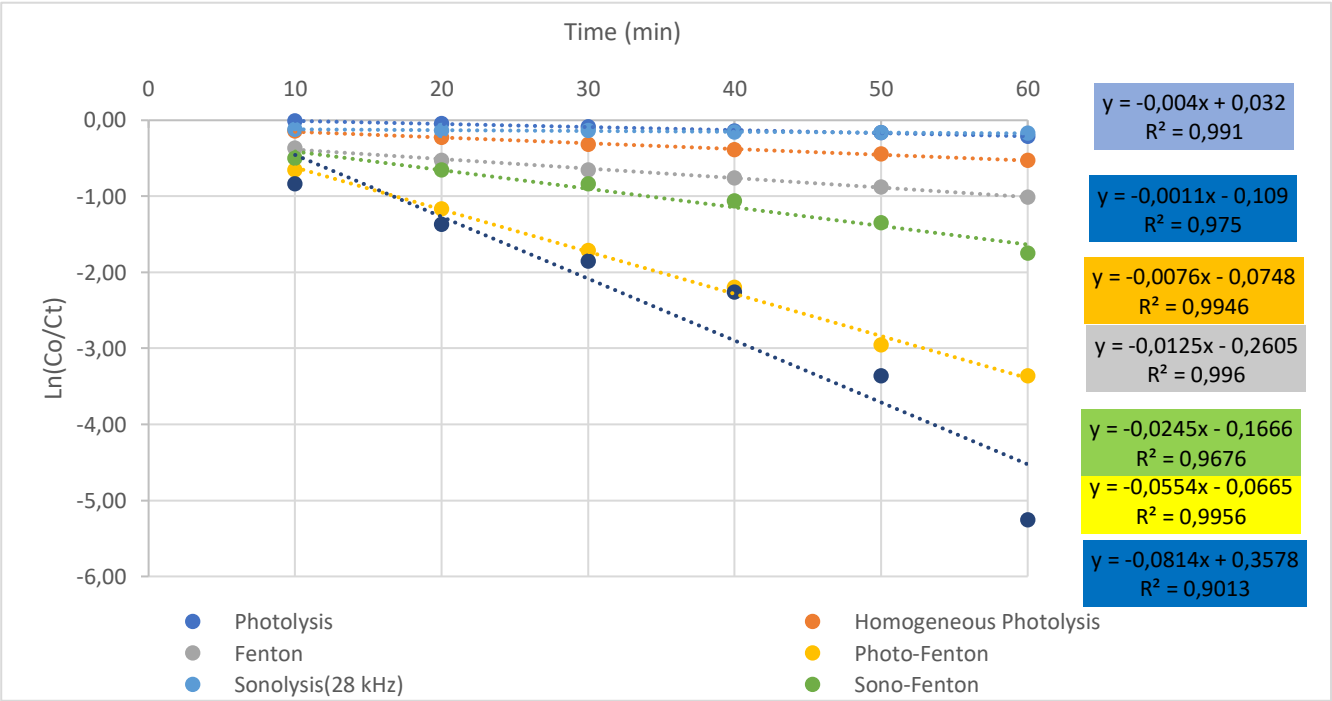



**Figure 5:** The determination of reaction kinetics of advanced oxidation process based on TOC removal according to Pseudo first order kinetic

According to Figure 7, four type AOPs used in this work showed first order kinetic fitting high liner regression ($R^2$>0,99). The first order reaction rates of Photolysis (UV), Sonolysis (US), Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Photo-Fenton ($Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV), Sono-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$) and Sono-Photo-Fenton (US- $Fe^{+2}$-$H_2O_2$-UV) processes were determined as 0.004, 0.0011, 0,0125, 0.0554, 0.245 and 0.814 $min^{-1}$ respectively. The $LC_{50}$ concentrations of treated wastewater and un-treated wastewater were given in Table 3 comparing 25 mg/L phenol solutions as control. The toxicity reduction expressed as dimensionless relative toxicity (RT) bias to $LC_{50}$ concentrations of un-treated wastewater were illustrated in Figure 6

**Table 3:** Toxicity assessment of AOPs for TCEP treatment

| Sample | $LC_{50}$ concentration | RTI |
|---|---|---|
| **Control** | 25.00 | - |
| **Untreated wastewater** | 2.00 | 1.00 |
| **Photolysis** | 4.00 | 0.50 |
| **Sonolysis (28 kHz)** | 5.00 | 0.40 |
| **Homogeneous Photolysis** | 9.00 | 0.22 |
| **Fenton** | 12.00 | 0.17 |
| **Photo-Fenton** | 42.00 | 0.05 |
| **Sono-Fenton** | 45.00 | 0.04 |
| **Sono-Photo-Fenton** | 56.00 | 0.04 |

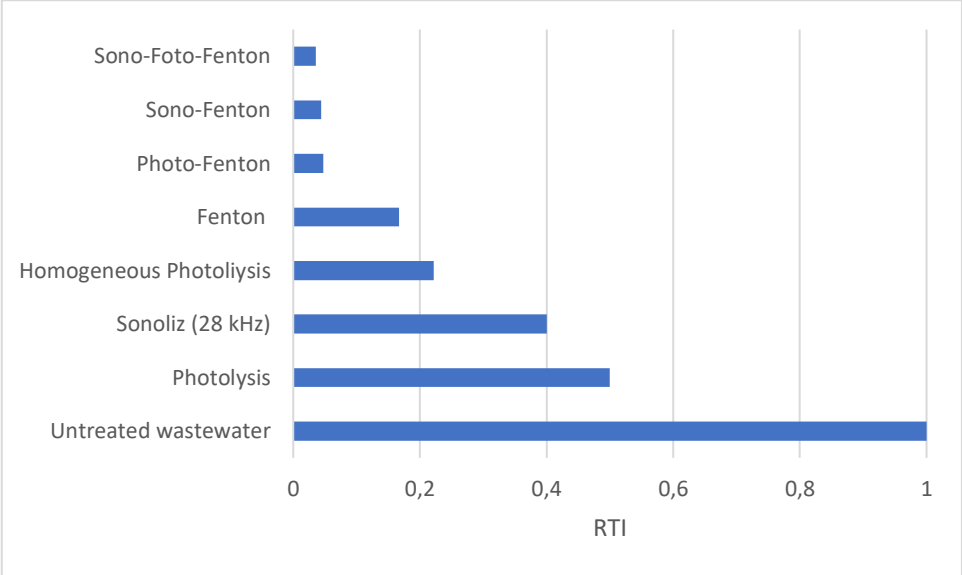



**Figure 6:** The toxicity evaluation of advanced oxidation process

Toxicity assessment showed that 1000 mg/L TCEP containing wastewater had a high toxic effect on *Vibrio fischeri* bacteria. The $LC_{50}$ concentration of untreated wastewater was calculated as 20 mg/L (2%). In this paper, even if the Photolysis, Sonolysis, homogenous Photolysis and Fenton treatment slightly reduced the toxicity of untreated wastewater in parallel with TOC removal, the toxicity of wastewater was significantly decreased with Photo-Fenton ($UV-Fe^{+2}-H_2O_2$) Sono-Fenton ($US-Fe^{+2}-H_2O_2$) and Sono-Photo-Fenton ($US-UV-Fe^{+2}-H_2O_2$) treatment.

## CONCLUSION

In this paper, the degradation of TCEP, which was frequently encountered in wastewater treatment plants, was successfully examined by advanced treatment methods from water to eliminate the disadvantages of conventional wastewater treatment methods. Photolysis, Sonolysis, Fenton, Homogeneous Photolysis, Photo-Fenton, Sono-Photo-Fenton treatment methods were used for TCEP removal. In order to enhance single treatment of these methods, the hybrid Photo-Fenton treatment was performed for model wastewater with high TCEP concentration. The removal efficiencies of Sono-Photo-Fenton treatment method were determined with total organic carbon (TOC) analyses identifying TCEP.

As a result of the treatment studies, 99.5% TOC removal was achieved by the treatment of TCEP with Sono-Photo-Fenton process, while the cytotoxicity of water was significantly reduced. For future work, the reason why the wastewater had low toxic character related the mineralization product $PO_4^{3-}$ and $Cl^-$ after the wastewater treated with Sono-Photo-Fenton (US-UV-$Fe^{+2}$-$H_2O_2$).

**REFERENCES**

Abdullah, A. M., and Kevin E. O'Shea 2019. $TiO_2$ photocatalytic degradation of the flame-retardant tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) in aqueous solution: A detailed kinetic and mechanistic study." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 377: 130-137.

Hansson, H., et al.2015. Photo-Fenton and Fenton Oxidation of Recalcitrant Wastewater from the Wooden Floor Industry. Water Environment Research, 87(6): p. 491-497.

Horrocks, A.R., D. Price, and D. Price 2001., Fire retardant materials. woodhead Publishing.

Innes, A. and J. Innes 2015. Flame retardants, in Applied Plastics Engineering Handbook. 2011, Elsevier. p. 469-485.

Knudsen, G.A., et al. 2015. Estimation of tetrabromobisphenol A (TBBPA) percutaneous uptake in humans using the parallelogram method. Toxicology and applied pharmacology, 2015. 289(2): p. 323-329.

Koparal, A.S.2018. Sulardan Ultrases, Fenton ve Sono-Fenton Prosesleri ile Renk Giderimi. Anadolu University of Sciences & Technology-B: Theoretical Sciences, 2018. 6(2).

Liu, J., Ye, J., Chen, Y., Li, C., and Ou, H. 2018. UV-driven hydroxyl radical oxidation of tris (2-chloroethyl) phosphate: Intermediate products and residual toxicity. *Chemosphere*, *190*, 225-233.

Nass, B., et al. 2002. Phosphorus containing flame retardant-compounding and material properties. in Flame retardants.

Posner, S.2009. Guidance on alternative flame retardants to the use of commercial pentabromodiphenylether (c-PentaBDE). Norwegian Pollution Control Authority (SFT) on behalf of United Nations Environment Programme.

Ren, X., et al. 2008. Effect of tris-(2-chloroethyl)-phosphate (TCEP) at environmental concentration on the levels of cell cycle regulatory protein expression in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells. Chemosphere, 74(1): p. 84-88.

Ruan, X. C., Ai, R., Jin, X., Zeng, Q. F., and Yang, Z. Y. 2013. Photodegradation of tri (2-chloroethyl) phosphate in aqueous solution by UV/H 2 O 2. Water, Air, & Soil Pollution, 224(1), 1406.

Shaw, S., Halogenated flame retardants: do the fire safety benefits justify the risks? Reviews on environmental health, 2010. 25(4): p. 261-306.

Watts, Michael J., and Karl G. Linden 2008. "Photooxidation and subsequent biodegradability of recalcitrant tri-alkyl phosphates TCEP and TBP in water." *Water research* 42.20: 4949-4954.

Xu, X., Chen, J., Qu, R., & Wang, Z.(2017. Oxidation of Tris (2-chloroethyl) phosphate in aqueous solution by UV-activated peroxymonosulfate: kinetics, water matrix effects, degradation products and reaction pathways. *Chemosphere*, *185*, 833-843.

Van der Veen, I. and J. de Boer 2012. Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. Chemosphere, 88(10): p. 1119-1153.

Ye, J., Liu, J., Li, C., Zhou, P., Wu, S., & Ou, H. 2017. Heterogeneous photocatalysis of tris (2-chloroethyl) phosphate by UV/TiO2: Degradation products and impacts on bacterial proteome. *Water research*, *124*, 29-38.

# Preparation of chloride selective membrane electrode

Şükrü Kalaycı

*Gazi Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO Kimya Teknolojileri Bölümü, Ankara, Türkiye*

*skalayci@gazi.edu.tr*

## Abstract

In this study, the novel membrane chloride-selective electrode consisting of 30% of tridodesylmethylammoniumchloride (TDMC) as the active material, 50% of PVC as the membrane matrix and 20% of dibutylphatalate (DBF) as the plasticizer was developed. In this electrode, the potential change occurs from $10^{-5}$ to $10^{-1}$ M chloride ion and the slope of linear portion corresponds to 55,0 ± 2,0 mV per decade change of chloride concentration. Furthermore, the interference effects of some ions, such as $F^-$, $I^-$, $NO_3^-$, $SO_4^{2-}$, $Na^+$, $K^+$, $Cu^{2+}$ and $Fe^{3+}$ were not observed. The response time and lifetime of electrode was 60 s and 6 months, respectively. It has been observed that pH did not affect the sensitivity of the electrode. This electrode has been used for the direct determination of 32,0 ± 0,5 mg/L chloride in the spring water.
***Keywords:*** Chloride electrode; Determination; Membrane electrode; Chloride, Spring water.

## INTRODUCTION

In the literature, there were several liquid and polymer membrane-based ion-selective electrodes (ISEs) used for the determination of chloride [Oka ve ark.1991; Hartman ve ark. 1978; Willis ve ark. 1981; Hithachi 1982; Coetzee ve Freiser 1968-1969). The active components in these electrodes were the quaternary ammonium salts. The innate Hofmeister-type response of such sensors to lipophilic anions, such as salicylate, can lead to significant positive errors for determination of chloride in the blood samples obtained from patients with ingested Aspirin (Lewandowski 1989). Additionally, the positive interferences of bromide and added heparin can be also observed (Park ve ark. 1991).

The researchers developed a method for the fast preparation of chloride selective electrodes (Ag/AgCl electrodes) by dipping silver wire into the sodium hypochlorite solution (Jiang ve ark. 2015). They were prepared by different immersion time. Some properties of them, such as Nernst response, response time and long-term stability, were tested in the simulated concrete pore solutions (SCPS) (Duffo ve ark 2009; Climent-Lorca ve ark. 1996).

In principle, the determination of chloride is important in many different fields, such as clinical diagnosis (Jiang ve ark. 1998; Huber ve ark. 1998) environmental monitoring (Huber ve ark. 2000; Martin ve Narayanaswamy 1997) and various industrial applications (Badr ve ark. 1999; Ratjen ve Doring 2003). In general, the chloride ions associated with ions $Na^+$, $K^+$; $Mg^{2+}$ are present in the sea water and sediments of the Earth's crust in large quantities. Moreover, they are widely distributed to the nature as salts, such as NaCl, KCl, and $CaCl_2$ (Ottawa 1978). We have developed a new chloride selective electrode because of the fact that the determination of chloride in the spring water samples is essential (Somer ve ark. 2001).

The aim of this work was to prepare a selective electrode for chloride using ion exchanger as the active material. For this, the solid membrane electrodes were prepared using tridodesylmethyammoniumchloride (TDMACl), PVC and dibutylphtalate (DBF) in different compositions which were used as ion exchanger active material, inert matrix and plasticizer, respectively. Furthermore, their optimum working conditions were also investigated in detail and the interference studies were also performed. Then, the chloride ion in the spring water was determined by this prepared electrode.

## MATERIALS AND METHODS

### *Apparatus and reagents*

The potential was measured with JENWAY 3030 Ion Analyser. While a double junction Ag/AgCl electrode, 924036, was used as the outer reference electrode, as the inner reference electrode, the home-made Ag/AgCl electrode was prepared; it was immersed into a 0.1 M NaCl and 0.1 M KI solution. For the pH measurements, the ion analyser with 924003 combined with pH electrode was used. All measurements were performed with a 30 mL glass cell prepared for this purpose. A magnetic stirrer was used throughout the experiments. All reagents (NaCl, KBr, NaF, KI, $Fe_2(SO_4)_3$, $CuCl_2$, $AgNO_3$) were of at least analytical reagent grade (Merck). Triply distilled water purification system was used for the preparation of all solutions.

***Preparation of electrode***

100–250 mg of PVC dissolved in 3 mL tetrahydrofuran (THF), 90 mg of ion exchanger dissolved in 1 mL THF and 0.2 mL of DBF were mixed in a 30 mL beaker with a diameter of 4.2 cm and then the mixture was stirred by a magnetic stirrer. The solvent was then allowed to evaporate at ambient atmosphere for about 24 h. The membrane formed as a film in the bottom of the beaker was taken out carefully using Teflon forceps. Then, the film membrane was cemented to the flat end of a PVC tube (1 cm diameter) with an adhesive of PVC dissolved in THF. One day later, the excess membrane was cut and the tube was filled with 0.1 M NaCl and 0.1 M KI solution, respectively. A home-made Ag/AgCl electrode was then immersed as the inner reference electrode. For conditioning of the electrode, it should stay in $10^{-4}$ M NaCl solution for about 2 days [19].

## RESULTS

***Calibration curves of the electrode***

The potentiometric responses of the prepared electrodes were investigated against chloride concentration. For this purpose, appropriate amounts of chloride ions were spiked to the cell and the corresponding potentials were recorded. For a fixed ionic strength, all measurements were made in 0.1 M $NaNO_3$ solution. The potential readings were plotted against pCl. The slope of the electrode was found as about 58 mV and it was not changed for more than 6 months.

***Effect of membrane composition and thickness***

It is known that the detection limit, selectivity and the maintenance of the electrode depend on membrane composition and thickness. For this reason, the electrodes in different membrane compositions and thickness were prepared and their potential responses were measured in the range from $10^{-6}$ to $10^{-1}$ M chloride concentration for each 10 times of concentration change.

By the time membrane mixtures in different weight quantities were used in the same size of beakers, the thickness of membranes was also different. The membranes in 30% of TDMACl, 50% of PVC and 20% of DBF composition but at different masses (0.2, 0.3, 0.4 and 0.5g) were prepared and they were used as the active materials. For each electrode, the potential responses were measured at different chloride concentrations. In the concentration range from $10^{-5}$ to $10^{-1}$ M chloride, the slopes for 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 g of electrodes were about 24, 21, 58 and 31 mV, respectively (Fig. 1). It is known that the membrane thickness also plays an important role for the response of the electrodes. While the response time was short with thin membranes, its mechanical strength became less. Finally, it was found that the electrode with a total mass of 0.4 g had both the highest slope and good mechanical strength.

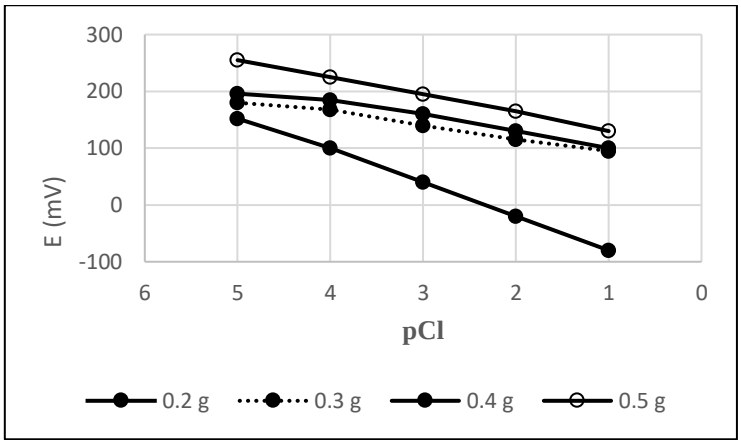



**Figure. 1.** Effect of membrane thickness on calibration curves.

Furthermore, to investigate the effect of composition, the electrodes in 0.4 g weight were prepared in different active material ratios, changing from 10 to 30% of TDMACl. The measured slopes of electrodes in different compositions were summarized in Table 1. As seen, because the electrode with 30% of TDMACl had the highest slope (about 58 mV), this electrode was used throughout the whole study.

**Table 1.** Effect of membrane composition on the response time of electrode (0.4 g) in 0.1 M $NaNO_3$.

| $[F^-]$ (M) | E (mV) | | |
|---|---|---|---|
| | 10% TDMACl, 60% PVC, 20% DBF | 20% TDMACl, 60% PVC, 20% DBF | 30% TDMACl, 50% PVC, 20% DBF |
| $1x10^{-5}$ | 192 | 180 | 152 |
| $1x10^{-4}$ | 174 | 155 | 100 |
| $1x10^{-3}$ | 150 | 125 | 40 |
| $1x10^{-2}$ | 131 | 90 | -20 |
| $1x10^{-1}$ | 105 | 50 | -80 |
| **$1x10^{-5}$ to $1x10^{-1}$ M Slope** | **21.8** | **32.5** | **58.0** |

***The response time of electrode***

The response time of the electrode was measured for different chloride concentrations because it depends strongly on the concentration change. For this purpose, the potential values based on time were recorded at different chloride concentrations. The response time of the electrode was found as 1 minute (Fig. 2).

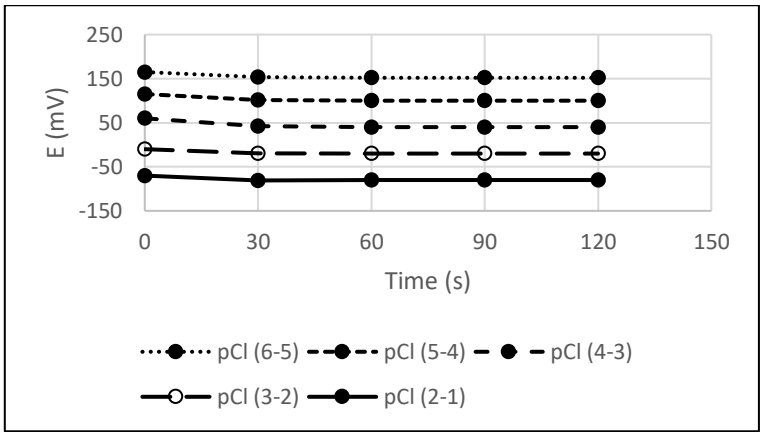



**Figure 2.** The dependence of response time on the change of concentrations.

### *Effect of pH*

The pH effect on the potential readings at 10 $^{-3}$ M chloride concentration was investigated in detail. For this purpose, the $10^{-3}$ M chloride solution was prepared and the pH of this solution was adjusted to certain values by the addition of both HCl and NaOH using a pH meter. For chloride concentration, the measured potentials at each pH values were plotted against pH. The potential readings remained unchanged within the pH range of 2–12 at $10^{-3}$ M chloride concentrations of chloride (Fig. 3).

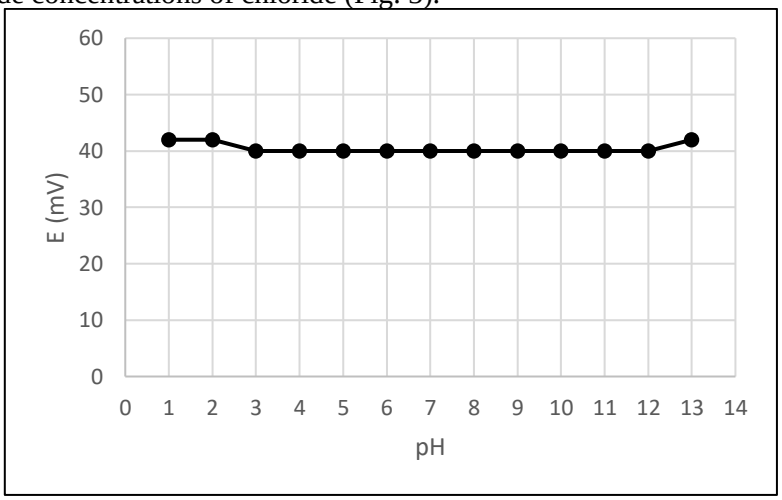



**Figure. 3.** Variation of the chloride electrode potential at 1.0x10$^{-3}$ M concentration with pH.

### *Interference studies*

The possible interference effects of some anions ($F^-$, $Br^-$, $I^-$, $SO_4^{2-}$) and cations ($Na^+$, $K^+$, $Cu^{2+}$, $Fe^{3+}$) were investigated. For this, selectivity coefficients mixed solution method was preferred as it usually corresponds more closely to the situation in the samples. In this method, solutions were prepared with a constant activity of the main ion (chloride) while varying activity of interfering ion. For this purpose, the interfering ion was added to $10^{-3}$ M chloride solution (in 0.1 M $NaNO_3$) so that its concentration was $10^{-2}$ to $10^{-3}$ M and after each addition, the change of potential was measured. Based on the experimental results, no interference effect was observed for $F^-$, $Br^-$, $I^-$, $SO_4^{2-}$ and for $Cu^{2+}$, $Fe^{3+}$.

The selectivity coefficients for the interfering ions were also calculated by using the mixed solution method (Srinivasan ve Rechnitz 1969).

$K_{A,B}^{pot}$ x $a_B^{nA/nB} = a_A\{\text{antilog}[(E_1 - E_2)/S]\} - a_A$ (1)

where S = 2.303RT/$n_A$ (the slope of chloride electrode), $a_A$ is the activity of the primary ion, $a_B$ is the activity of the interfering ion, $E_1$ is the potential measured when only A is present, $E_2$ is the potential responsive to the primary ion in the presence of interfering ioni $K_{A,B}^{pot}$ the selectivity coefficient and $n_A$, $n_B$ are the charges of A and B, respectively.

For the determination of the selectivity constant, the $a_B^{nA/nB}$ values were plotted against the right hand side of $E_q$. (1) and the slope was equal to the selectivity coefficient of the interfering ions. The selectivity coefficients obtained for some anions and cations were given in Table 2.

**Table 2.** Selectivity coefficients $\left(K_{A,B}^{pot}\right)$ for the chloride selective electrode in mixed solutions (in the presence of $1x10^{-5}$ M $Cl^-$)

| Ions | $K_{A,B}^{pot}$ |
|---|---|
| $Cl^-$ | $2x10^{-3}$ |
| $NO_3^-$ | $6x10^{-4}$ |
| $SO_4^{-2}$ | $7x10^{-6}$ |
| $PO_4^{-3}$ | $3x10^{-4}$ |
| $K^+$ | $2x10^{-3}$ |
| $Na^+$ | $1x10^{-3}$ |
| $Ag^+$ | $1x10^{-5}$ |
| $Ca^{+2}$ | $2x10^{-6}$ |
| $Cu^{+2}$ | $3x10^{-6}$ |
| $Mg^{+2}$ | $3x10^{-6}$ |

***Determination of chloride in spring water***

For this purpose, 500 mL of spring water sample was taken for the determination of chloride ion. The potential measurements in the sample including 0.1 M $NaNO_3$ were made using both the commercial electrode and the electrode prepared in this study. For the determination of chloride ion in the sample, different calibration graphs were drawn for both electrodes. From both calibration graphs, while the chloride concentration was determined as 33.0 ± 0.6 mg/L with commercial (Orion) electrode, it was determined as 32.0 ± 0.5 mg/L with the newly prepared electrode. The results were given for both electrodes based on 95% of confidence level using five different samples. The t-test was performed to compare the means of the results obtained from both electrodes. Based on the calculations, the results of both commercial and electrode prepared in this study were similar shown in Table 3.

**Table 3.** Chloride analysis in tea and comparison of results with commercial electrodes.

| Ion | Developed electrode | Commercial (Orion) electrode | $t_{experimental}$ $t_{critical}$=2,53 |
|---|---|---|---|
| [$Cl^-$] ( mg/L ) | 32 ± 0.5 | 33 ± 0.6 | 0,42 |

95% CI and N=5

**DISCUSSION**

In this proposed study, the new a selective electrode was used for the determination of chloride. This electrode showed 58 mV sensitivity to chloride concentrations in the range from $10^{-5}$ to $10^{-1}$ M. As a result of the analysis, the chloride concentration in the spring water sample was found to be 32 ± 0.5 mg/L based on 95% of confidence level in five measurements.

## CONCLUSION

In this study, a selective electrode sensitive to chloride ion was prepared. This electrode is susceptible to chloride concentration with an inclination of 58 mV. Factors affecting the sensitivity of the electrode were examined and the most suitable conditions were determined. The chloride ion in the spring water was determined both with the electrode we prepared and with the commercial chloride electrode. The results were found to be in harmony with each other.

## REFERENCES

A. Martin, R. Narayanaswamy, Studies on quenching of fluorescence of reagents in aqueous solution leading to an optical chloride-ion sensor, Sensor and Actuator B-Chem. 39 (1997), 330-333.

C. Huber, T. Werner, C. Krause, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, Energy transfer-based lifetime sensing of chloride using a luminescent transition metal complex, Anal. Chim. Acta 364 (1998), 143-151.

C. Huber,I. Klimant, C. Krause, T. Werner, T. Mayr, O.S. Wolfbeis, Fresenius J. Anal. Chem. 368 (2000), 196-202.

C. V. Coetzee, H. Freiser, Anion-responsive electrodes based on ion association extraction systems, Anal. Chem. 40 (1968), 2071-2071.

C. V. Coetzee, H. Freiser, Liquid-liquid membrane electrodes based on ion-association extraction systems, Anal. Chem. 41 (1969), 1128-1130.

F. Ratjen, G. Doring, Cystic fibrosis, Lancet, 361 (2003), 681-689.

G.S. Duffó, S.B. Farina, C.M. Giordano, Characterization of solid embeddable Reference electrodes for corrosion monitoring in reinforced concrete structures[J*]*. Electrochimica Acta, 54 (2009), 1010–1020.

G. Somer, Ş. Kalayci, G. Ekmekci, Preparation and application of iodide–mercury selective membrane electrode based on ion exchangers, Sensors and Actuators B, 81 (1) (2001), 122-127.

Hitachi, Ltd. Jpn. Tokkyo Koho No. 5,757,655, 1982.

I.H.A. Badr, M. Diaz, M.F. Hawthorne, L.G. Bachas, Mercuracarborand "Anti-Crown Ether"-Based Chloride-Sensitive Liquid/Polymeric Membrane Electrodes, Anal. Chem. 71 (1999), 1371-1377.

J. Willis, C. Young, R. Martin, P. Stearns, M. Pelosi, D. Magnanti, The Clinical-evaluation of bis crown ether based potassium-ion selective electrodes, Clin. Chem. 29 (1983), 1193-1198.

K. Hartman, S. Luterotti, H. Osswald, M. Oehme, P. Meyer, D. Ammann, W. Simon, Chloride-selective liquid-membrane electrodes based on lipophilic methyl-tri-N-alkyl-ammonium compounds and their applicability to blood serum measurements, Microchim. Acta, 70 (3-4) (1978), 235-246.

K. Srinivasan, G.A. Rechnitz, Selectivity studies on liquid membrane, ion selective electrodes, Analytical Chemistry, 41(10) (1969), 1203-1208.

L. Jiang, H. Liu, Y. Wang, Influence of flexural fatigue on chloride threshold value for the corrosion of steels in $Ca(OH)_2$ solutions[J]. Materials Chemistry and Physics, 164 (2015), 23–28.

M.A.Climent-Lorca, E. Viqueira-Pcrez, M.M. Lopez-Atalaya. Embeddable Ag/AgCI sensors for In-situ monitoring chloride contents in concrete[J]. Cement and Concrete Research, 26 (8) (1996), 1157–1161.

Ottowa, Department of National Health and Welfare (Canada). Guidelines for Canadian drinking water quality. Supporting documentation. Ottawa, 1978.

R. Lewandowski, T. Sokalski,A. Hulanicki, Influence of aspirin on in vitro direct potentiometry of Cl-in serum, Clin. Chem. 35 (1989), 2146-2146.

S. B. Park, W. Matuszewski, M.E. Meyerhoff, Y. H. Liu, K.M. Kadish, Potentiometric anion selectivities of polymer membranes doped with indium(III)-porphyrins, Electroanalysis 3 (1991), 909-913.

S. Oka, Y. Sibazaki, S. Tahara. Direct potentiometric determination of chloride ion in

whole blood, Anal. Chem. 53 (1981), 588-593.

Q. S. Jiang, D. Mak, S. Devidas, E.M. Schwiebert, A. Bragin, Y.L. Zhang, W.R. Skach, W.B. Guggino, J.K. Foskett, J.F. Engelhardt, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator–associated ATP release is controlled by a chloride sensor, J. Cell Biol. 143 (1998), 645-657.

# B12 vitaminin diferansiyel puls polarografisi ile tayini

Şükrü Kalaycı

ÜGazi Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO, Kimya Teknolojileri Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: skalayci@gazi.edu.tr

## Özet
B12 vitamini, cobalamin adıyla da bilinen bir vitamin türüdür. B12, DNA sentezi, sinir sistemi, kırmızı kan oluşumu ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere birçok metabolizma aktivitesinde yer alır. Bu nedenle, B12 vitamini tayini için yüksek hassasiyete sahip DPP yöntemini seçtik. Bu belirleme, B12 vitamini yapısında bulunan kobalt ile mümkün olmuştur. Co (IIII), vitaminin oksidatif sindirimi sırasında oluştuğundan, polarografik davranışının asetat, borat, fosfat ve amonyak gibi çeşitli elektrolitlerde belirlenmesi gerekiyordu. En uygun elektrolitler olarak 1.0 M $NH_3$ / $NH_4^+$ (pH = 9.8) ve 1.0 M AcOH / AcO- (pH = 4.0) bulunan bu elektrolitlerde Co (III) polarogramları alınmıştır. Bu yöntem, 1mL'lik bir ampulde yüksek hassasiyetle B12 vitamini tayini başarıyla uygulandı. LOD (S / N = 3) için 3.7x10-7 olarak bulunmuştur. Co (III) yanında Zn (II), Ni (II), Cr (III), Fe (III), Cu (II), Cd (II) ve Se (IV) 'ün girişim etkileri de incelenmiştir. Amonyum tamponunda sadece Zn (II) tepe noktasının örtüşen bir Co (III) tepe noktasına sahip olduğu bulundu. Bu problem 1.0 M AcOH / AcO- (pH = 4.0) tamponu içinde çözülerek çözülebilir. 1 mL vitamin ampulünde 1000 ug olan B12,% 95 güven aralığı ve 4 ölçüm sonucunda 999 ± 15 ug bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** B12 Vitamini, Tayin, Kobalt, Diferansiyel puls polarografisi, Girişim.

# Determination of vitamin B12 using differential pulse polarography

## Abstract
Vitamin B12 is a type of vitamin also known by the name cobalamin. B12 is involved in many metabolism activities, including DNA synthesis, nervous system, red blood formation and immune system. Therefore, we chose the DPP method, which has a high sensitivity for the determination of vitamin B12. This determination was possible with cobalt present in vitamin B12 structure. Since Co (IIII) is forms during oxidative digestion of vitamin, its polarographic behavior had to be determined in various electrolytes such as acetate, borate, phosphate and ammonia. The polarograms of Co (III) were taken in these electrolytes which 1.0 M $NH_3$/$NH_4^+$ (pH=9.8) and 1.0 M AcOH/$AcO^-$ (pH=4.0) were found as the most suitable electrolytes. This method was successfully applied vitamin of B12 determination in a 1mL ampoule with high precision. The LOD was found as $3.7x10^{-7}$ for (S/N=3). Besides Co (III), interference effects of Zn (II), Ni (II), Cr (III), Fe (III), Cu (II), Cd (II) and Se (IV) were also studied. It was found that only Zn (II) peak had an overlap Co (III) peak in ammonium buffer. This problem could be solved by working in 1.0 M AcOH/$AcO^-$ (pH=4.0) buffer. B12, which is 1000 µg in 1 mL vitamin ampoule, was found as 999 ± 15 µg as a result of 95% confidence interval and 4 measurements.

**Keywords:** Vitamin B12, Determination, Cobalt, Differential pulse polarography, Interferences studies.

## GİRİŞ
B12 vitamini, kobalamin olarak da bilinen bir vitamin türüdür ve diğer B vitaminleri gibi suda çözünür bir vitamindir. DNA sentezi, sinir sistemi, kırmızı kan oluşumu ve bağışıklık sistemi gibi birçok metabolizma aktivitesinde yer almaktadır. Kimyasal yapısı oldukça karmaşıktır. Orta bölgede çok nadir bir biyokimyasal kobalt minerali vardır ve bu kobalamine bu mineral adı verilmiştir. B12, kobalt analizi kullanılarak yapılır. Elektrokimyasal yöntemler, kobalt tayininde yüksek hassasiyet ve düşük girişim etkisi nedeniyle tercih edilir. Diferansiyel nabız polarografisinin bazı avantajları vardır. DPP, eser elementlerin eser miktarlarının belirlenmesinde zenginleştirme ve ekstraksiyon gerektirmeyen bir yöntemdir. Bu tür tespitler pek çok analitik yöntemde nadiren mümkündür (Somer and Çalışkan 2009; Somer ve ark. 2016). Bazı girişim çalışmaları DP polarografi ile kolaylıkla yapılabilir, farklı yöntemlerle karşılaştırıldığında tekrarlanabilirlik çok yüksektir (İnam ve Somer 1998; Taşkoparan ve Somer 2009; Somer ve Taşkoparan 2005). Birkaç oksidasyon sayısına sahip aynı katyonlar DPP ile kolayca belirlenebilir. Sn (II) 'nin Sn (IV) ile belirlenmesi ve As (III)' ün As (V)

ile belirlenmesi bu örnekleri verebilir (Ünal ve Somer 2011 (1-2)). Yukarıda verilen yöntemlerle belirlenmesi çok kolay olmayan askorbik asit (Şahbaz ve Somer 1992), K3 vitamini (Somer ve Doğan 2008), ürik asit (Somer ve Çalışkan 2014) ve nitrit (Somer ve ark. 2016) gibi bazı moleküller DP polarografik yöntemlerimizle de belirlenebilir.
B12 vitamini tabletlerindeki B12, yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi ile saptanarak belirlendi (Moore ve ark. 2015). Hem gıdalarda hem de premikslerde bulunan B12 vitamini, UV tespiti ile ters fazlı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir (Li ve ark. 2000). C18 katı faz ekstraksiyonu ve UV-Vis dedektörü ile Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile miktar tayini temelinde deniz suyunda B12'nin doğrudan belirlenmesi için yeni bir yöntem rapor edilmiştir (Heudi ve ark. 2006).
UV-görünür spektrofotometrik, adsorptif sıyırma voltametrisi ve metal iyonlarının kılcal elektroforetik çalışması incelenmiş ve B12 vitamininde Co (III) tayini için uygulama yapılmıştır (Okba Sergi 2004). Altın türevli elektrot kullanılarak farmasötik preparatlarda B12 Vitamini içeriğini belirlemek için yarı türev voltametrik tepe akım yöntemi uygulanmıştır (oxpring ve ark. 1996). B12 vitamininin elektrokimyasal davranışını ve elektroanalitik tayinini incelemek için kullanılan bir ex situ plaklı bizmut-film elektrodunun (BiFE) performansını araştırmak için sıyırma voltametri (CV) ve kare dalga adsorptif sıyırma voltametrisi (SWAdSV) kullanılmıştır (Yang ve ark. 2005). Vitamin B12'deki İz Kobalt, bir Co (II) -timol ftalin-nitrit kompleksi kullanılarak polarografi ile belirlenir. Bu adsorptif dalga ile B12 vitaminindeki kobaltın belirlenmesi mümkün olmuştur (Kreft ve ark. 2012). B12 Vitamini Tespiti için Kendinden Katalitik Karbon Macun Elektrotları inşa edildi ve farmasötik ürünlerde ve biyolojik matris ortamında B12 Vitamini miktarını belirlemek için kullanıldı (Tomcik ve ark. 2004).
Bu çalışmada, içerdiği kobalt ile B12 vitamini belirlenmiştir. B12 vitamini analizinde yüksek hassasiyetli diferansiyel nabız polarografisi kullanıldı. Bu analizde diğer katyonların girişim etkileri incelenmiştir. B12 vitamini tayini için uygun ortam araştırıldı ve ampuldeki B12 vitamini bu yöntemle analiz edildi.

## MATERYAL VE METOT

PAR cıva düşüş zamanlayıcısı ile donatılmış bir PAR (Model 174A) polarografik analiz sistemi kullanılmıştır. Civa elektrodunun doğal düşme süresi 2-3 saniye (2.37 mg / sn) arasındaydı. 3-elektrot konfigürasyonunda, sıvı birleşim ile ayrılmış, referans doymuş bir kalomel elektrotlu (SCE) bir Kalousek elektrolitik hücre kullanıldı, böylece IR düşüşü ortadan kaldırılabilir. Karşı elektrot platin teldi. Polarogramlar bir Linseis (LY1600) X-Y kaydedici ile kaydedildi. DP polarogramları, 1 saniyelik bir düşme ömrü, 5 mV / s'lik bir tarama hızı ve 50 mV'luk bir darbe genliği koşulları altında kaydedildi.
Standart 0.1 M Co (II), Pb (II), Zn (II), Ni (II) ve Cu (II) çözeltileri standart nitrat çözeltilerinden hazırlandı. Bununla birlikte, Fe (III), Cr (III) ve Cd (II) çözeltileri, klorür tuzları kullanıldı.
*B12 vitamini çözeltisinin hazırlanması:* Kobalt, B12 vitamininin organik yapısında bulunduğundan, aşağıda verilen şekilde konsantre asit karışımı ile ayrıştırılması gerekti, böylece organik yapı ayrıştı ve Co (III) iyonları çözelti içinde çözülebilirdi. . Böylece, çözünmüş Co (III) 'ten B12 vitamini tayin etmek mümkün olmuştur. B12 molekülünün imhası için, Co (III) belirlenebilmesi için, ampulden alınan 1 mL B12 vitaminine 0.5 mL H2SO4 ve 5 mL HN03 ilave edildi. Solüsyon berraklaşana kadar bekletildi. Daha sonra çözelti çalkalanırken, çözelti yaklaşık 0.5 mL olana kadar ısıtıldı. Soğuduğunda nihai çözelti damıtılmış su kullanılarak 1 mL yapıldı. Bu asitlerin eklenmesi ile organik yapı parçalanacak ve Co (III) iyonları serbest kalacaktır.

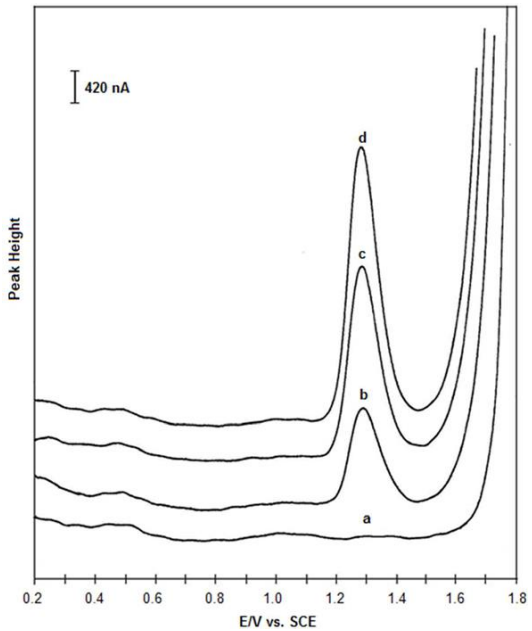
## BULGULAR

### Co (III) için optimum çalışma koşullarının belirlenmesi

Asitlerle yıkımdan sonra B12 vitamininde Co (III) olarak kobalt iyonu bulunduğundan, tayini için en iyi ortamın incelenmesi gerekiyordu. Bu amaçla pH = 2, 4 ve 5 AcOH elektrolit, borat, fosfat ve NH3 / NH4Cl tamponu gibi çeşitli elektrolitlerde DP polarogramları alındı ve 1x10-5 M Co (III) için tepe potansiyelleri ve tepe yükseklikleri belirlendi ( Tablo 1). Tablo l'den görülebileceği gibi, Co (III) tayini için en uygun elektrolitler, pik yükseklikleri nedeniyle 1.0 M $NH_3$ / $NH_4CI$ (pH = 9.8) ve 1.0 M AcOH / AcO- (pH = 4.0) olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, sadece 1.0 M $NH_3$ / $NH_4CI$ (pH = 9.8) elektrolitinde Co (III) tepe noktası yüksek ve keskindi. 1.0 M AcOH / AcO- (pH = 4.0) elektrolitte ise tepe noktası yeterince yüksekti, ancak amonyaktaki kadar keskin değildi. Şekil 1, Kobalt tayini için bir örnek olarak verildi.

**Tablo 1**. $1x10^{-5}$ M Co (III) ün değişik tampon çözeltilerindeki pik potansiyelleri ve pik şekilleri

| Ortam | İyon | Pik potensiyeli (V) | Pik yüksekliği (mm) | Pik şekli |
|---|---|---|---|---|
| 1.0 M Borat tamponu (pH=9.5) | $1x10^{-5}$ M $Co^{3+}$ | -1.43 | 11±1 | Yayvan |
| 1.0 M Fosfat tamponu (pH=9.6) | $1x10^{-5}$ M $Co^{3+}$ | -1.64 | 11±1 | Yayvan |
| 1.0M Asetat tmponu (pH=4.0) | $1x10^{-5}$ M $Co^{3+}$ | -1.35 | 33±1 | Yayvan |
| 1.0 M amonyaktamponu (pH=9.8) | $1x10^{-5}$ M $Co^{3+}$ | -1.28 | 32±1 | Keskin |




a) 10 mL 1.0 M $NH_3$ / $NH_4Cl$ tamponu (pH=9.8)
b) a + 0.1 mL $1x10^{-3}$ M Co(III)
c) b+ 0.1 mL $1x10^{-3}$ M Co(III)
d) c+ 0.1 mL $1x10^{-3}$ M Co(III)

Şekil 1. $1x10^{-5}$ M Co (III) in 1.0 M $NH_3$ / $NH_4Cl$ tamponunda (pH=9.8) tayini.

**Girişim Çalışması**

Ampuldeki B12 vitamininin bileşiminde Co (III) dışında bir element yoktur. Bununla birlikte, bazı elemanlar bazı amaçlar için eklenebilir. Bu durumda, bazı parazitler görülebilir.

En yaygın iyonlar Fe (III), Zn (II), Ni (II), Cu (II), Cr (VI), Se (IV), Cd (II) ve Pb (II) olası girişimleri açısından araştırıldı etki. Yukarıda verilen iyonların pik potansiyelleri, iki farklı elektrolitte, 1.0 M $NH_3$ / $NH_4CI$ (pH = 9.8) ve AcOH / AcO- (pH = 4.0) üzerinde incelenmiştir, çünkü bunlar Co (III) tayinleri için en iyi elektrolitlerdir.

Pik potansiyelleri Tablo 2'de özetlenmiştir. Görülebileceği gibi 1.0 M $NH_3$ / $NH_4CI$'de (pH = 9.8) Zn (II) dışında herhangi bir iyonla pik çakışma olmayacaktır. Bu ortamda Co (III) pik -1.28 V iken, Zn pik -1.32 V idi ve her ikisi de keskinti. Yani, Zn (II) varlığında, Co (III) tayini 1.0 M $NH_3$ / $NH_4CI$'de (pH = 9.8) doğru olmayacaktır.

**Tablo 2.** Co(III) ,Zn(II) , Ni (II), Cr(VI), Fe(III), Cu(II), Cd(II) and Se(IV) in $NH_3$ / $NH_4$ tamponundaki (pH=9.8) pik potansiyelleri ve şekilleri.

| Ortam | İyonlar | Pik potansiyeli (V) | Pik yüksekliği (mm) | Pik şekli |
|---|---|---|---|---|
| 1.0 M $NH_3$/ $NH_4Cl$ Buffer (pH=9.8) | $1x10^{-5}$ M Co(III) | -1.28 | 32±1 | Keskin |
| | $1x10^{-5}$ M Zn(II) | -1.32 | 30±1 | Keskin |
| | $1x10^{-5}$ M Ni(II) | -1.09 | 22±1 | Keskin |
| | $1x10^{-5}$ M Cr(VI) | -0.28 | 45±1 | Keskin |
| | $1x10^{-5}$ M Fe(III) | Pik yok | Pik yok | Pik yok |
| | $1x10^{-5}$ M Cu(II) | -0.47 | 17±1 | Keskin |
| | $1x10^{-5}$ M Cd(II) | -0.78 | 53±1 | Keskin |
| | $1x10^{-5}$ M Se(IV) | -1.60 | 35±1 | Yayvan |

Öte yandan AcOH elektrolitinde (pH = 4.0), Tablo 3'te, Zn ve Co (III) arasında pik çakışma yoktur. Bununla birlikte, Zn piki keskinken, Co (III) piki genişti ve bu nedenle Co (III) tayininin doğruluğu yüksek olamaz. AcOH elektrolit (pH = 4.0) ortamında Co (III) için düşük doğruluk nedeniyle, daha ileri çalışmalarımızda Co (III) tayini için NH3 tamponu kullanmayı tercih ettik. Bununla birlikte, Zn (II) iyonunun varlığında, Co (III) AcOH (pH = 4.0) ortamında, ancak düşük doğrulukta Tablo 3 ile belirlenebilir.

Tablo 3. $1x10^{-5}$ M Co (III), Zn (II) ve Fe (III) ün asetat tamponundaki (pH=4.0) pik potansiyelleri ve şekilleri.

| 1.0M AcOH/$AcO^-$ Tamponu | İyonlar | Pik Potansiyeli (V) | Pik Yüksekliği (mm) | Pik Şekli |
|---|---|---|---|---|
| **pH=4** | **$1x10^{-5}$ M Co(III)** | **-1.35** | **29±1** | **Yayvan** |
| **pH=4** | **$1x10^{-5}$ M Zn(II)** | **-1.02** | **35±1** | **Keskin** |
| **pH=4** | $1x10^{-5}$ M Fe(II) | Pik yok | Pik yok | Pik yok |

**AcOH / AcO- (pH = 4.0) elektrolit kullanılarak Zn (II) ve Fe (III) içeren yapay olarak hazırlanmış bir çözeltide Co (III) tayini**

Her biri $1x10^{-3}$ M Co (III), Fe (III) ve Zn (II) içeren bir numune hazırlandı, bu 0.1 mL'den alındı ve 10 mL AcOH / AcO- (pH = 4.0) içerisine ilave edildi. polarografik hücrede tampon. -1.02 V'ta Zn (II) için bir tepe noktası ve -1.35 V'de Co (III) için bir tepe noktası gözlemlendi. $1x10^{-5}$ M Co (III). LOD, S / N = 3 ile $1x10^{-6}$ M olarak bulundu. Sonuçlar Tablo 4'te verilmektedir.

Tablo 4. $1x10^{-5}$ M (Fe(III), Co(III) and Zn(II) içeren yapay örneğin 1M AcOH/ $AcO^-$ pH=4.0 tamponundaki Co(III)`in tayini.

| Ortam | Çözeltideki $[Co^{3+}]$ (M) Derişimi | Tayin Edilen $[Co^{3+}]$ (M) Derişimi | $\bar{x}$ | s | $\bar{x} \pm ts /$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1M AcOH/$AcO^-$ Tamponu (pH=4.0) | $1x10^{-5}$ | $0.91x10^{-5}$<br>$0.92x10^{-5}$<br>$0.94x10^{-5}$<br>$0.91x10^{-5}$ | $0.92x10^{-5}$ | $2.75x10^{-7}$ | $(0.92 \pm 0.05)\ x10^{-5}$ |

% 90 Güven aralığı N=4.

**Ampulde B12 vitamini tayini**

Sülfürik asit Nitrik asit karışımında çözülen 1 mL B12 örneğinden, 0.1 mL'lik bir numune alınır ve 10 mL NH3 / $NH_4Cl$ tamponu (pH = 9.8). Co (III) için -1.28V'da bir zirve gözlendi, karışan iyon yoktu, aynı ampul içindeki B12 miktarı, 1000 ug yerine (999 ± 15) ug, (tablo 5) olarak bulunmuştur.

Table 6**.** B12 vitamin ampülündeki B12 tayini (1000 µg).

| Ortam | Ampüldeki $B_{12}$ (µg) | Tayin edilen $B_{12}$ (µg) | $\bar{x}$ | s | $\bar{x} \pm ts / \sqrt{N}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.0 M $NH_3$/ $NH_4Cl$ tamponu (pH=9.8) | 1000 | 976<br>1016<br>990<br>1016 | 999 | 24 | 999 ± 24 |

% 90 Güven aralığı N=4.

**TARTIŞMA**

Bu araştırmada, B12 vitamini tayini için yüksek tekrarlanabilirliğe sahip yeni ve oldukça hassas bir DPP yöntemi oluşturulmuştur. B12 vitamininin konsantre asit karışımı ile çözündürülmesi sırasında, organik yapı ayrıştırıldı ve Co (III) iyonları çözelti içinde çözülebilir. Böylece, çözünmüş Co (III) 'ten B12 vitamini tayin etmek mümkün olmuştur. Co (III) 'ün polarografik tespiti için optimum çalışma koşullarının incelenmesi gerekiyordu. 1.0 M $NH_3$ / $NH_4CI$ (pH = 9.8) tampon Co (III) ve ayrıca B12 vitamininin yüksek tekrarlanabilirlik ile tespit edilebileceği bulunmuştur. Bu ortamda LOD (S / N = 3) $3.7x10^{-7}$ M'dir. Fe (III), Zn (II), Ni (II), Cr (VI), Cu (II), Cd (II ) ve Se (IV) iyonları da incelenmiştir. 1 M $NH_3$ / $NH_4CI$ (pH = 9.8) tamponunda sadece Zn (II) iyonu ile bir üst üste binme olduğu bulundu. Bununla birlikte, 1.0 M AcOH / AcO-

(pH = 4.0) tamponunda tepe üst üste binme yoktu ve girişim elimine edilebilir. Her iki ortamda da, vitamin B12'yi yüksek doğrulukla belirlemek mümkün oldu.

**SONUÇ**

B12 vitaminin, belli tampon çözeltilerinde polarogramları alındı ve pik potansiyelleri ile şekilleri incelendi. Buradan B12 içerisindeki Co (III) için en uygun ortamın amonyak ortamı olduğu belirlendi.
Çözeltide kobalt dışında diğer iyonların bulunabileceği düşünülerek girişim etkileri incelendi. pH= 9.8 de kobalt ile çinkonun piklerinin yakın olduğu ve analizinde hata oluşturacağı tespit edildi. Zn olduğu ortamda kobaltı asetat ortamında tayin edilmesinin daha doğru sonuçlar vereceğine karar verildi.
B12 vitamini kobalt üzerinde amonyak ortamında gerçek değerine yakın bir değerde ölçülmüştür.

**KAYNAKLAR**

Heudi, O., Kilinc, T., Fontannaz, P., Marley, E. (2006) Determination of Vitamin B12 in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction. *Journal of Chromatography A*, 101

Inam, R., Somer, G. (1998) An unusual polarographic behavior of selenite in the presence of some cations. *Analytical Sciences*, 14, 399-403.
(1-2), 63-68.

Kreft, G. L., De Braga, O. C., Spinelli, A. (2012) Analytical electrochemistry of vitamin B12 on a bismuth-film electrode surface. *Electrochimica Acta*, 83, 125-132.

Li, H.B., Feng, C., Yue, J. (2000) Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 891(2), 243-247.

Moore, M. E., Watters, M., David, A. K., David, M., Alastair, G. (2015), Vitamin B12 and cognitive impairment. In Martin, Colin R. and Preedy, Victor R.(ed), Diet and nutrition in dementia and cognitive decline, Elsevier, London, Eng., pp.637-648. doi: 10.1016/B978-0-12-407824-6.00059-8.

Okba, M., Sergi, A. (2004) A new method for the determination of Vitamin B12 in seawater. *Analytica Chimica Acta*, 517(1-2), 33-38.

Oxspring, D. A., Maxwell, T. J., Smyth, W. F. (1996) UV-visible spectrophotometric, adsorptive stripping voltammetric and capillary electrophoretic study of 2-(5′- bromo-2′-pyridylazo) -5 -diethylaminophenol and its chelates with selected metal ions: application to the determination of Co(III) in vitamin B12. *Analytica Chimica Acta*, 323(1-3), 97-105.

Sahbaz, F., Somer, G. (1992) Determination of ascorbic acid in fruit and vegetables using normal polarography. *Food Chemistry*, 44, 141-146.

Somer, G., Çalışkan, A.C. (2009) A new method for the simultaneous determination of Fe(III), Cu(II), Pb(II), Zn(II), Cd(II), and Ni(II) in wine using differential pulse Polarography. *J.Applied Electrochem*., 39, 2027-2033.

Somer, G., Çalışkan, A.C., Sendil, O. (2014) A new sensitive method for the determination of trace mercury by differential pulse polarography: Application to raw salt sample. *J. of Analytical Chemistry*, 11, 1083-1088.

Somer, G., Doğan, M. (2008) Direct and indirect methods for the determination of vitamin K3 using differential pulse polarography and application to pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*, 74, 96-100.

Somer, G., Kalaycı, S., Almas, Z. (2016) A new, fast and sensitive method for the determination of trace amounts of nitrite using differential pulse polarography. *Nitric oxide*, 57, 79-84.

Somer, G., Kalayci, S., Sendil, O. (2016) A nem and direct method for the determinations of trace elements in spinach using differential pulse polarography. *J. Electroanalytical Chem.*, 778, 49-52.

Somer, G., Taskoparan, Ü. (2005) Interference between selenium and some trace elements during polarographic studies and its elimination. *Talanta*, 65, 598-602.

Taşkoparan, Ü., Somer, G. (2009) Investigation of polarographic interference between Se (IV) and Cr (VI), its elimination and application to Gerede river water. *J. Electroanalytical Chem.*, 633, 193-197.

Tomčik, P., Banks, C. E., Trevor, D., Compton, R. G. (2004) A Self- Catalytic carbon Paste Electrode for the Detection of Vitamin B12. *Analytical Chemistry*, 76(1), 161-165.

Ünal, Ü., Somer, G. (2011) Simultaneous determination of trace Sn (II) and Sn (IV) using differential pulse polarography and application. *Turkish J.Chem.*, 35, 73-85.

Ünal, Ü., Somer, G. (2011) A new and simple procedure for the polarographic speciation and determination of trace inorganic As(III) and As(V) species. *TurkishJ. Chem.*, 35, 779-792.

Yang, N., Wan, Q., Wang, X. (2005) Voltammetry of Vitamin B12 on a thin self-assembled monolayer modified electrode. *Electrochimica Acta*, 50(11), 2175-2180.

# Coronene surface as alpha radiation binder

Caglar CELIK BAYAR*

*Zonguldak Bulent Ecevit University, Faculty of Engineering, Department of Metallurgical and Materials Engineering, Zonguldak, Turkey.

*Corresponding author e-mail: caglarbayar@gmail.com, caglarbayar@beun.edu.tr

## Abstract

Coronene consisting of six peri-fused benzene rings is a polycyclic aromatic hydrocarbon and known as superbenzene. It is produced in the petroleum-refining process of hydrocracking and generally used in graphene synthesis. It serves as an interesting organic material with its aromatic property since it is a planar circulene including high π-conjugation. Therefore, it was thought to have a great potential of capturing hazardous alpha radiation in the present study. The coronene molecule optimized at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level had a point group of $D_{6h}$. It had potentially two benzene rings which could interact with an alpha particle ($He^{2+}$) in a long-range; the central ring ($R_1$) and one of the neighboring rings ($R_2$). The interaction of $He^{2+}$ and coronene central ring was abbreviated as $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ complex whereas that of the neighboring ring as $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ complex in which C represents the coronene molecule. $[C\text{-}R_2\ldots He]^{2+}$ complex was thermodynamically more stable than $[C\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ complex. The stabilities were directly in relation with the rings' NICS(1) aromaticity values. Central ring aromaticity value appeared lower than that of the neighboring ring. The interaction energies were exothermic for both complexes however, the formation of $[C\text{-}R_2\ldots He]^{2+}$ complex was more exothermic than that of $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ complex. According to the frontier molecular orbital analysis performed at the same theoretical level: a) Both complexes were found to be softer than coronene in terms of reactivity. b) The complexes both had more electrophilic character than coronene. c) The complexes were more resistant to oxidation than coronene.

**Keywords:** Coronene, Alpha radiation, DFT, M06-2X, NICS(1), BSSE.

## INTRODUCTION

Coronene (Figure 1), known as superbenzene, is a polycyclic aromatic hydrocarbon consisting of six peri-fused benzene rings (Fetzer and Winefordner, 2000). It is a yellow solid which is embedded in a very rare sedimentary rock mineral called carpathite. It forms needle-like crystals with a monoclinic structure. The γ form exists as the most stable polymorph while β form can also be produced in an applied magnetic field (Potticary et al., 2016) or in a way of performing phase transition from γ by decreasing the temperature at 158 K (Salzillo et al., 2018). It can be dissolved in common organic solvents like benzene, toluene and dichloromethane. Its solutions emit blue light fluorescence under UV light. It is produced in the petroleum-refining process of hydrocracking and generally used in graphene synthesis. If it is evaporated onto a copper surface at 1000 ° C, after a while graphene lattice appears onto a surface (Wan et al., 2013).

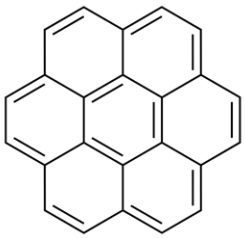


**Figure 1.** The chemical structure of coronene molecule.

An alpha particle ($He^{2+}$), structurally equivalent to the nucleus of a helium atom, consists of two protons and two neutrons. During the process of nuclear decay, the liberated energy (decay energy) is shared between the daughter nucleus and the alpha particle. The two neutrons of an alpha particle give it additional mass that further facilitates ionization by coulombic interaction or even direct collision of the alpha particle with atomic electrons. Alpha particles as well as other types of charged particles dissipate their energy during these collisions mainly by two mechanisms: ionization and electron excitation. The high mass and charge of an alpha particle, relative to other forms of nuclear radiation, give it greater ionization power but a poorer ability to penetrate matter (L'Annunziata, 2007).

Coronene, which is a planar circulene including high π-conjugation and serves as an interesting organic material with its aromatic property, was thought to have a great potential of capturing hazardous alpha radiation and to be oxidized consequently, in the present study. The coronene molecule had a high symmetry with a point group of $D_{6h}$. It had potentially two benzene rings which could interact with an alpha particle ($He^{2+}$) in a long-range; the central ring ($R_1$) and one of the neighboring rings ($R_2$) (Figure 1). The interaction of $He^{2+}$ and coronene central ring was abbreviated as $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ complex whereas that of the neighboring ring as $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ complex in which C represents the coronene molecule. Such a study did not exist neither experimentally nor theoretically in the literature. Therefore, it revealed the originality of the work.

## METHOD

A density functional, M06-2X, developed by Zhao and Truhlar (Zhao and Truhlar, 2008) provides an accurate description of the noncovalent interactions and is a hybrid functional with 54% Hartree-Fock exchange. Therefore, this functional was chosen for the evaluation of the complexes studied in this work. All the calculations were performed in the gas phase using Gaussian 09 program software (Frisch et al., 2009). The structure optimizations were performed at DFT M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory. The interaction energies of both complexes were calculated using the same level of theory and corrected with basis set superposition error (BSSE) contributions (Ebrahimi et al., 2014) after performing the pre-optimizations at semi-empirical and Hartree-Fock levels. BSSE corrections use the Boys and Bernardi counterpoise technique (Ebrahimi et al., 2014) which are due to overlap of the wave functions of the moieties (Mottishaw and Sun, 2013). The calculations of the considered complexes contained zero point energy corrections and had no imaginary frequencies which indicated that they stood for no transition states or saddle points on the potential energy surfaces.

The diamagnetic and paramagnetic effects of ring currents related to aromaticity and anti-aromaticity can be gauged by Nucleus Independent Chemical Shift (NICS) criterion (Schleyer et al., 1996). The NMR calculations were performed at DFT M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory using Gauge Independent Atomic Orbital (GIAO) method (Ebrahimi et al., 2014). Since NICS at 1 Å above the centre of the ring, NICS(1), was recommended as a better aromaticity diagnostic than the NICS(0) (NICS at the center of the ring) (Ebrahimi et al., 2014), NICS(1) calculations were performed for the considered complexes.

## RESULTS and DISCUSSION

### Total Electronic Energy and Interaction Energy Calculations

The total electronic energies of the complexes were presented in Table 1. $[Coronene\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ complex was found to be 220 cal/mol less stable than $[Coronene\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ complex, thermodynamically. Note that the interaction distances of the rings and $He^{2+}$ were almost the same for the two complexes (d $[C\text{-}R_1\ldots He^{2+}]$ = 2.76 Å, d $[C\text{-}R_2\ldots He^{2+}]$ = 2.77 Å).

**Table 1.** The total electronic energies of the complexes calculated at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level

| | $E_{tot} = E^0$+ZPE (au) | $E_{rel}$ (au) | $E_{rel}$ (kcal/mol) |
|---|---|---|---|
| $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ | -923.50289 | 0.00000 | 0.000 |
| $[C\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ | -923.50254 | 0.00035 | 0.220 |

Interaction energy is a valid way of measuring the stability and strength of a complex (Yuan et al., 2014). It is denoted as $E_{int} = E(A\text{-}B) - [E(A) + E(B)]$ in case of a A-B complex formation from the fragments of A and B. The BSSE corrected interaction energies of the complexes were listed in Table 2. The interaction energies were both exothermic (-1392.186 kcal and -1392.404 kcal for $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ and $[C\text{-}R_2\ldots He]^{2+}$ complexes,

respectively) which indicated that the formation of $[C\text{-}R_2\ldots He]^{2+}$ complex was 218 cal/mol more exothermic (stable) than that of $[C\text{-}R_1\ldots He]^{2+}$ complex.

**Table 2.** The BSSE corrected interaction energies of the complexes calculated at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level

| | $E_{tot} = E^0+ZPE$ (au) | $E_{BSSE}$ (au) | $E_{int}$ (au) | $E_{int}$ (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|
| Coronene | -921.28387 | | | |
| $He^{2+}$ | 0.00000 | | | |
| $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ | -923.50289 | 0.000051024 | -2.21897 | -1392.404 |
| $[C\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ | -923.50254 | 0.000047143 | -2.21862 | -1392.186 |

**NICS(1) Aromaticity Analyses**

Both the considered rings of coronene, $C\text{-}R_1$ (central ring) and $C\text{-}R_2$ (neighboring ring), were aromatic but $C\text{-}R_2$ NICS(1) value was more negative than that of $C\text{-}R_1$ (Table 3). It indicated that $C\text{-}R_2$ was more aromatic than $C\text{-}R_1$ since the more negative NICS values implied the more aromaticity (Schleyer et al., 1996).

**Table 3.** NICS(1) (ppm) values of $C\text{-}R_1$ and $C\text{-}R_2$ rings calculated at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level

| Ring | NICS(1) (ppm) |
|---|---|
| $C\text{-}R_1$ | -3.68 |
| $C\text{-}R_2$ | -11.95 |

**Frontier Molecular Orbitals, Reactivities and Stabilities**

Mulliken electronegativity ($\chi_M$), electronic chemical potential ($\mu$), absolute hardness ($\eta$), global softness (S), electrophilicity index ($\omega$) and $f_{H/L}$ index are important properties to understand the chemical reactivity of the compounds. They are obtained according to the equations (1) - (5) below:

$\chi_M = -\mu = (I + A) / 2$ (1) (Pearson, 1997)

$\eta = (I - A) / 2$ (2) (Singh et al., 2004)

$S = 1 / (2\ \eta)$ (3) (Singh et al., 2004)

$\omega = \mu^2 / (2\ \eta)$ (4) (Parr et al., 1999)

$f_{H/L} = \varepsilon_{HOMO} / \varepsilon_{LUMO}$ (5) (Rokhina and Suri, 2012)

I and A are the ionization potential and electron affinity, respectively (Pearson, 1997). Note that $I = -\varepsilon_{HOMO}$ and $A = -\varepsilon_{LUMO}$ within the validity of the Koopmans' theorem (Koopmans, 1934), where $\varepsilon_{HOMO}$ and $\varepsilon_{LUMO}$ are the energies of the highest occupied molecular orbital and lowest unoccupied molecular orbital, respectively.

According to the frontier molecular orbital analyses performed at the same theoretical level (Table 4): a) Both complexes were found to be softer than coronene in terms of reactivity ($S_{Complexes} = 10.68\ eV^{-1}$, $S_{Coronene} = 4.66\ eV^{-1}$) which specified that the complexes had more tendency to give a chemical reaction with a softer specie than coronene. In parallel, coronene was found to be harder than the considered complexes ($\eta_{Coronene} = 0.11$ eV, $\eta_{Complexes} = 0.047$ eV). b) The complexes both had more electrophilic character than coronene ($\omega_{Complexes} = 0.0054$ eV, $\omega_{Coronene} = 0.0011$ eV) which supported the reactivity phenomena described in "a". c) The complexes were more resistant to oxidation than coronene which were obtained by computing the $f_{H/L}$ indexes ($f_{H/L(Complexes)} = 1.22$; $f_{H/L(Coronene)} = 6.89$). Note that the species which has the lower $f_{H/L}$ index show more persistent character to oxidation than the species which has the higher $f_{H/L}$ index (Rokhina and Suri, 2012).

**Table 4.** The reactivities and stabilities of coronene and the considered complexes calculated at DFT UM06-2X/6-31+G(d,p) theoretical level

| | ŋ (eV) | S ($eV^{-1}$) | ω (eV) | $f_{H/L}$ |
|---|---|---|---|---|
| Coronene | 0.11 | 4.66 | 0.0011 | 6.89 |
| $[C\text{-}R_1\text{-}He]^{2+}$ | 0.047 | 10.68 | 0.0054 | 1.22 |
| $[C\text{-}R_2\text{-}He]^{2+}$ | 0.047 | 10.68 | 0.0054 | 1.22 |

## CONCLUSION

The conclusion of this study were listed with some major outcomes:
1. It was concluded that coronene might serve as an efficient surface for alpha particle capturing by both of its rings $R_1$ and $R_2$, but predominantly by $R_2$, thermodynamically ($R_1$: central ring, $R_2$: neighboring ring).
2. The reactivity and stability predictions through the frontier molecular orbital analyses provided to conclude that the considered coronene-alpha particle complexes were softer than coronene which denoted that the complexes had more potential to react with a softer specie. They had more electrophilic character implying that they were more active towards a chemical reaction with a nucleophile. Additionally, they showed more persistent character to oxidation than coronene since coronene was already oxidized with an alpha particle in both complexes.
3. The possible interactions of coronene and alpha particle were evaluated within the limitation of the method and basis set used. However, it was possible to do relative comparisons.

## ACKNOWLEDGEMENT

The author would like to thank to Zonguldak Bulent Ecevit University Scientific Research Projects Coordination Office for financial support (Project No. BAP-2016-73338635-02).

## REFERENCES

Ebrahimi A, Karimi P, Akher FB, Behazin R, Mostafavi N 2014. Investigation of the π-π stacking interactions without direct electrostatic effects of substituents: The aromatic‖aromatic and aromatic‖anti-aromatic complexes. Molecular Physics, 112(7): 1047-1056.

Fetzer JC, Winefordner JD 2000. Large (C> = 24) polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry and analysis. New York: Wiley, 304 pp.

Frisch MJ, Trucks WG, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, et al. 2009. Gaussian 09, Revision A.02. Wallingford CT: Gaussian, Inc.

Koopmans T 1934. Über die zuordnung von wellenfunktionen und eigenwerten zu den einzelnen elektronen eines atoms [About the assignment of wave functions and eigenvalues to the individual electrons of an atom]. Physica, 1(1-6): 104-113.

L'Annunziata MF 2007. Radioactivity: Introduction and history. Amsterdam: Elsevier Science, 632 pp.

Mottishaw JD, Sun H 2013. Effects of aromatic trifluoromethylation, fluorination, and methylation on intermolecular π-π interactions. The Journal of Physical Chemistry A, 117(33): 7970-7979.

Parr RG, Szentpály Lv, Liu S 1999. Electrophilicity index. Journal of the American Chemical Society, 121(9): 1922-1924.

Pearson RG 1997. Chemical hardness: Applications from molecules to solids. Weinheim: Wiley-VCH, 208 pp.

Potticary J, Terry LR, Bell C, Papanikolopoulos AN, Christianen PCM, Engelkamp H, Collins AM, Fontanesi C, Kociok-Köhn G, Crampin S, et al. 2016. An unforeseen polymorph of coronene by the application of magnetic fields during crystal growth. Nature Communications, 7(11555): 1-7.

Rokhina EV, Suri RPS 2012. Application of density functional theory (DFT) to study the properties and degradation of natural estrogen hormones with chemical oxidizers. Science of the Total Environment, 417-418: 280-290.

Salzillo T, Giunchi A, Masino M, Bedoya-Martínez N, Valle RGD, Brillante A, Girlando A, Venuti E 2018. An alternative strategy to polymorph recognition at work: The emblematic case of coronene. Crystal Growth & Design, 18(9): 4869-4873.

Schleyer PvR, Maerker C, Dransfeld A, Jiao H, van Eikema Hommes NJR 1996. Nucleus-independent chemical shifts: A simple and efficient aromaticity probe. Journal of the American Chemical Society, 118(26): 6317-6318.

Singh PP, Srivastava HK, Pasha FA 2004. DFT-based QSAR study of testosterone and its derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12(1): 171-177.

Wan X, Chen K, Du J, Liu D, Chen J, Lai X, Xie W, Xu J 2013. Enhanced performance and fermi-level estimation of coronene-derived graphene transistors on self-assembled monolayer modified substrates in large areas. The Journal of Physical Chemistry C, 117(9): 4800-4807.

Yuan K, Guo Y-J, Yang T, Dang J-S, Zhao P, Li Q-Z, Zhao X 2014. Theoretical insights into the host-guest interactions between [6]cycloparaphenyleneacetylene and its anthracene-containing derivative and fullerene $C_{70}$. Journal of Physical Organic Chemistry, 27(10): 772-782.

Zhao Y, Truhlar DG 2008. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. Theoretical Chemistry Accounts, 120(1-3): 215-241.

# Chemical composition of essential oils of *Hypericum perforatum* L. growing wild in Turkey

Omer Elkiran*

*Sinop University, Vocational School of Health Services, Department of Environmental Health Programme, Sinop, Turkey.
* Corresponding author e-mail: omer_elkiran@hotmail.com

**Abstract**
The chemical composition of the essential oils obtained from the leaves of *Hypericum perforatum* naturally grown in Turkey. The essential oil components determined by GC and GC-MS and chemical differences were discussed in means of chemotaxonomy. The aerial parts of the plant samples were hydro-distilled to produce oils in the yields of 2%. Twenty seven components were identified representing 98.8% of the oils. The main compounds in the essential oil of *H. perforatum* were; α -Pinene (22.1%), β-Caryophyllene (13.3%), β-Cubebene (13.1%) and 2-Methyloctane (10,1%).
**Keywords:** *Hypericum perforatum*, GC-MS, Essential oil, Chemotaxonomy

## INTRODUCTION

The genus *Hypericum* belongs to the Clusicaceae and encompasses 460 species worldwide of which ca. 89 species are found in Turkey. *Hypericum perforatum* to the Section *Hypericum* Robson in Flora of Turkey. *H. perforatum* has leaves narrowly ovate or lanceolate to elliptic-oblong or linear, sessile or sub sessile, plane, and large pellucid dots (Davis, 1967). *Hypericum* species have been used in the traditional medicine for centuries and many of them have great economic importance as natural sources of active compounds (Hosni et al., 2013). Among them, *H. perforatum*, commonly known as St. John's Wort, is traditionally used as a medicinal species for the treatment of mild to moderate depression as well as anxiety and insomnia (Morshedloo et al., 2015; Karppinen et al., 2010; Barnes et al., 2001; Greeson et al., 2001).

The essential oils of *Hypericum* species grown in different regions of the world have been extensively examined by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (Pirbalouti et al., 2014). Typical essential oil constituents for *Hypericum* species include the monoterpenes a- and b-pinene, limonene and myrcene; the sesquiterpenes b-caryophyllene and caryophyllene oxide; and hydrocarbons such as n-decane, C16- and C29 alkanes and C24, C26 and C28 alkanols(Crockett, 2010; Nahrstedt and Butterweck, 1997).

*H. perforatum* has great versatility in medicine and its diversity in plant morphology, chemotype and essential oil composition make this plant as a continuous subject of interest (Morshedloo et al., 2015; Chauhan et al., 2011).

The aim of the study, to determine the chemical essential oil profile of *H. perforatum*, intraspecific means and to contribute the systematics of the species. However, the results were discussed with the genus patterns of *Hypericum* in means of chemotaxonomy.

## MATERIAL AND METHOD

### Plant materials

*H. perforatum* specimens were collected Sinop in 2016.

### Isolation of the essential oils

Air-dried aerial parts of the plant materials (100 g) were subjected to hydro distillation using a Clevenger-type apparatus for 3 h to extract the essential oil.

**Gas chromatography (GC) analysis**

The essential oil was analyzed using HP 6890 GC equipped with a FID detector and an HP-5 MS column (30m×0.25mm i.d., film thickness 0.25 mm) and the capillary column were used. The column and analysis conditions were the same as in GC-MS. The percentage composition of the essential oils was computed from GC–FID peak areas without correction factors.

**Gas chromatography/Mass spectrometry (GC-MS) analysis**

The oil samples were analyzed by GC-MS, using a Hewlett Packard system. HP-Agilent 5973N GC-MS system with 6890 GC is in Çankırı Karatekin University, Faculty of Science, Department of Chemistry. HP-5 MS column (30m×0.25mmi. d., film thickness 0.25 mm) was used with helium as the carrier gas. Injector temperature was $250^0$ C, split flow was 1ml/min. The GC oven temperature was kept at $70^0$ C for 2 min and programmed to $150^0$ C at a rate of $10^0$ C / min and then kept constant at $150^0$ C for 15 min to $240^0$ C at a rate of 5 0 C/min. Alkanes were used as reference points in the calculation of relative retention indices (RRI). MS were taken at 70 EV and at a mass range of 35–425. Component identification was carried out using spectrometries electronic libraries (WILEY, NIST). The identified constituents of the essential oils are listed in Table 1. The chromatogram was obtained and it is shown in Figure 1.

**RESULTS AND DISCUSSION**

For the purpose of studying the chemical composition of the essential oils (Eos) of *H. perforatum* were collected from Sinop, Turkey. Eos of dried leaves of *H. perforatum* were analyzed by GC and GC-MS in terms of their chemical composition. The results of the analysis of Eos of *H. perforatum* leaves are presented in Table 1 and in Fig. 1. In the essential oil of *H. perforatum* leaves, 27 compounds were identified, representing 98.8% of the total oil (Fig. 1). While α-Pinene was at the highest percentage (22.1%), β-Caryophyllene (13.3%), β-Cubebene (%13.1) and 2-Methyloctane(%10.1) were also detectedas the major compounds in the oil profile (Table 1).

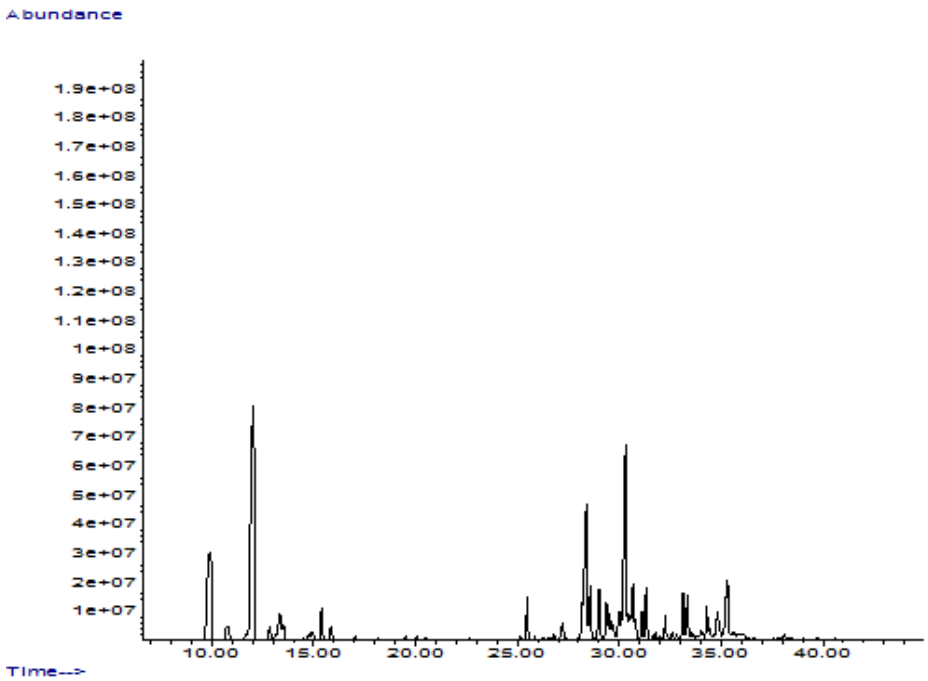



**Figure 1.** Gas chromatographic-flame ionization detector (GC-FID) profile of the essential oil of leaves of *H. perforatum*

**Table 1.** Chemical Composition of the leaves of *H. perforatum*

| No | RT (min.) | RI | Compounds | % |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9.898 | 1066 | 2-Methyloctane | 10.1 |
| 2 | 10.773 | 1086 | Nonane | 1.3 |
| 3 | 12.027 | 1113 | α-Pinene | 22.1 |
| 4 | 12.841 | 1131 | Nonane, 3-methyl- | 0.7 |
| 5 | 13.333 | 1142 | β –Pinene | 2.2 |
| 6 | 13.507 | 1146 | Myrcene | 0.8 |
| 7 | 15.383 | 1187 | 2-Methyldecane | 1.5 |
| 8 | 15.850 | 1197 | Pentadecane | 0.6 |
| 9 | 25.474 | 1409 | Elixene | 1.6 |
| 10 | 27.222 | 1447 | Eremophilene | 1.1 |
| 11 | 28.379 | 1472 | β –Caryophyllene | 13.3 |
| 12 | 28.578 | 1477 | Caryophyllene | 2.6 |
| 13 | 29.012 | 1487 | β-Farnesene | 2.6 |
| 14 | 29.370 | 1494 | Alloaromadendrene | 1.7 |
| 15 | 29.489 | 1497 | 1-Dodecanol | 1 |
| 16 | 29.617 | 1500 | β-Gurjunene | 1.3 |
| 17 | 30.011 | 1509 | γ-Muurolene | 1.8 |
| 18 | 30.306 | 1515 | β-Cubebene | 13.1 |
| 19 | 30.450 | 1518 | β-Selinene | 0.9 |
| 20 | 30.674 | 1523 | γ-Gurjunene | 4.7 |
| 21 | 31.121 | 1533 | γ-Cadinene | 1.2 |
| 22 | 31.317 | 1537 | δ-Cadinene | 2.3 |
| 23 | 32.253 | 1558 | Nerolidol | 0.9 |
| 24 | 33.133 | 1577 | Guaiyl acetate | 2 |
| 25 | 34.293 | 1603 | Cyclododecane | 1.7 |
| 26 | 34.818 | 1614 | tau-Cadinol | 1.7 |
| 27 | 35.312 | 1625 | 1-Hexadecanol | 4 |
| Total | | | | 98.8 |

RI: Retention indices, RT: Retention time

Several differences have been found in the composition of *H. perforatum* Eos obtained from different geographic regions. However, our findings show similarity to the reports indicating α-Pinene as the major compound of *H. perforatum* extracted from the plants cultivated in Turkey, India, Greece, Serbia, Italy (Cakir et al., 1997; Weyerstahl et al., 1995; Pavlovic et al., 2006; Saroglou et al., 2007; Pintore et al., 2005). While α-Pinene was first major compounds in our report, *cis*-Caryophyllene (48.5%), *β*-Caryophyllene (14.2-11.7%), Germacrene D (20.0%), Caryophyllene oxide (6.1–35.8%), 2-Methyl-octane (21.1%), (E)-Caryophyllene (21.6–23.0%) were first major compound in different regions (Gudžić et al., 1997; Gudžić et al., 2001; Baser et al., 2002; Nogueira et al., 1998; Mockutė et al., 2003; Pintore et al., 2005; Maggi et al., 2010; Guedes et al., 2012).

And also, β-Caryophyllene and 2-Methyloctane were major compounds in essential oils of *H. perforatum* from Serbia, Portugal, Uzbekistan, Lithuania, Italy, Greece and Estonia samples. Contrarily, compound such as β-Cubebene, which have been reported as main component of our report, were not detected or major compound at all in the investigated samples (Morshedloo et al., 2015; Pirbalouti et al., 2014; Crockett et al., 2010; Saroglou et al., 2007; Rancic et al., 2005; Cırak et al., 2010; Smelcerovic et al., 2007; Yüce, 2016).

Characterization of essential oil from species of the *Hypericum* genus revealed the presence of monoterpenoid and sesquiterpenoid constituents, as well as alkanes and aldehydes, as the main constituents in the most of the plants (Pirbalouti et al., 2014; Mathis and Ourisson, 1964a; Mathis and Ourisson, 1964b; Mathis and Ourisson, 1964c). Our results are in agreement with those of others reporting sesquiterpenes as the main constituents.

A comparison of our results with the previous reports on the chemical composition of *Hypericum* species suggests differences in the volatile composition of the plant material could be attributed to genetic (genus, species, sub species and ecotype), chemotype, distinct environmental and climatic conditions, seasonal sampling periods, geographic origins, plant populations, vegetative plant phases and extraction and quantification methods (Pirbalouti et al., 2014; Ghasemi et al., 2013; Guedes et al., 2004; Petrakis et al., 2005; Radusiene et al., 2005; Southwell et al., 2001; Teixeira et al., 2013).

## CONCLUSION

In conclusion, EO composition of the members of *H. perforatum* displays similarity. Likewise, this study demonstrates the occurrence of α-Pinene (22.1%), β-Caryophyllene (13.3%), β-Cubebene (%13.1) and 2-Methyloctane (%10.1) in leave EO of *L. nobilis* in Black Sea region of Turkey. The essential oil compositions of different parts of *Hypericum* samples have also shown that they can be used as raw material for medicinal and pharmaceutical purposes and natural products.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Sinop University Scientific Research Coordination Unit. Project Number: 1901-14-05.

## REFERENCES

Baser KHC, Ozek T, Nuriddinov HR, Demirci AB 2002. Essential oils of two *Hypericum* species from Uzbekistan. Chemistry of Natural Compounds, 38: 54-57.

Barnes J, Anderson LA , Phillipson JD 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53: 583-600.

Cakir A, Duru ME, Harmandar M, Ciriminna R, Passannanti S, Piozzi F 1997. Comparison of the volatile oils of *Hypericum* scabrum L. and *Hypericum perforatum* in Turkey. Flavour Fragrance Journal, 12:285-287.

Chauhan R, Vashistha R, Nautiyal M. Tava A, Cecotti R 2011. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. from cultivated source. Journal of Essential Oil Research, 23:20–25.

Cırak C, Bertoli A, Pistelli L, Seyis F 2010. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* from wild populations of northern Turkey. Pharmaceutical Biology, 48: 906-914.

Crockett SL 2010. Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). Natural Product Communications,5:1493-506.

Davis PH 1967. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 2, University Press, Edinburgh: pp. 355-401.

Ghasemi PA, Hashemi M, Taherian Ghahfarokhi F 2013. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. Industrial Crops and Products, 48: 43-48.

Gudžić B, Nedeljković J, Đorđević S, Čomor J 1997. Composition and anti-microbial activity of essential oil of Hyperici herb (*Hypericum perforatum* L.) from Vlasina Region. Facta Universitatis,1: 47-51.

Gudžić B, Đorđević S, Palić R, Stojanovi G 2001. Essential oils of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum perforatum* L. Flavour and Fragrance Journal, 16: 201-203.

Guedes AP, Amorim LR, Vicente A, Fernandes-Ferreira M 2004. Variation of the essential oil content and composition in leaves from cultivated plants of *Hypericum androsaemum* L. Phytochemical Analysis, 15:146-51.

Guedes AP, Franklin G, Fernandes-Ferreira M 2012. *Hypericum* sp.: essential oil composition and biological activities. Phytochemistry Reviews, 11:127-152.

Greeson JM, Sanford B, Monti DA 2001. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. Psychopharmacology, 153: 402-414.

Hosni K, Msaâda K, Taârit MB, Marzouk B 2013. Fatty acid composition and tocopherol content in four Tunisian *Hypericum* species: *Hypericum perforatum*,*Hypericum tomentosum*, *Hypericum perfoliatum* and *Hypericum ericoides* Ssp Roberti. Arabian Journal of Chemistry, 10: 2736-2741.

Karppinen K, Taulavuori E, Hohtola A 2010. Optimization of protein extractionfrom *Hypericum perforatum* tissues and immunoblotting detection of hyp-1 atdifferent stages of leaf development. Molecular Biotechnology, 46: 219-226.

Maggi F, Cecchini C, Cresci A, Coman M, Tirillini B, Sagratini G, Papa F, Vittori S 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum* Taxa (Guttiferae) growing in Central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). Chemistry & Biodiversity, 7: 447-466.

Mathis C, Ourisson G 1964a. Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*: II. Identification de constituants de diverses huiles essentielles d'*Hypericum*. Phytochemistry, 3:115-31.

Mathis C, Ourisson G 1964b. Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*: III. Re´partition des carbures satures et des monoterpe'nes dans les huiles essentielles d'*Hypericum*. Phytochemistry, 3:133-41.

Mathis C, Ourisson G 1964c. Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*: IV. Repartition des sesquiterpenes, des alcools monoterpeniques et des aldehydes satures dans les huiles essentielles d'*Hypericum*. Phytochemistry, 3: 377-8.

Mockutė D, Bernotienė G, Judžentienė A 2003. Volatile compounds of the aerial parts of wild St. John′s wort (*Hypericum perforatum* L.) plants. Chemija, 14:108-111.

Morshedloo MR, Ebadi A, Maggi F, Fattahi R, Yazdani D, Jafari M 2015.Chemical characterization of the essential oil compositions from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L. Industrial Crops and Products, 76:565-73.

Nahrstedt A, Butterweck V 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. Pharmacopsychiatry, 30:129-34.

Nogueira T, Duarte F, Venâncio F, Tavares R, Lousã M, Bicchi C, Rubiolo P 1998. Aspectos Quimiotaxonómicos do Género *Hypericum* L. em Portugal. Silva Lusitana, 6:55-61.

Pavlovic M, Tzakou O, Petrakis PV, Couladis M 2006. The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum* tetrapterum Fries and *Hypericum* olympicum L. growing in Greece. Flavour and Fragrance Journal, 21: 84-87.

Petrakis PV, Couladis M, Roussi V 2005. A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: The case of five Hellenic *Hypericum* L. species. Biochemical Systematics and Ecology, 33: 873-98.

Pintore G, Chessa M, Boatto G, Cerri R, Usai M, Tirillini B 2005. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. var. *angustifolium* DC growing wild in Sardinia (Italy). Journal of Essential Oil Research, 17: 533-535.

Pirbalouti AG, Fatahi-Vanani M, Craker L , Shirmardi H 2014.Chemical composition and bioactivity of essential oils of *Hypericum helianthemoides*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum scabrum*. Pharmaceutical Biology, 52: 175-181.

Radusiene J, Judzentiene A, Bernotiene G 2005. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. Biochemical Systematics and Ecology, 33: 113-124.

Smelcerovic A, Spiteller M, Ligon AP, Smelcerovic Z, Raabe N 2007. Essential oil composition of *Hypericum* L. species from Southeastern Serbia and their chemotaxonomy. Biochemical Systematics and Ecology, 35: 99-113.

Rancic A, Sokovic M, Vukojevic J, Simic A, Marin P, Duletic-Lausevic S 2005. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Myrrhis odorata* (L.) Scop, *Hypericum perforatum* L. and *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. Journal of Essential Oil Research, 17: 341-345.

Saroglou V, Marin PD, Rancic A, Veljic M, Skaltsa H 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. Biochemical Systematics and Ecology, 35: 146-152.

Southwell IA, Bourke CA 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). Phytochemistry, 56: 437-41.

Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng NR, Nogueira JM, Saraiva JA, Nunes ML 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93: 2707-14.

Weyerstahl P, Splittgerber U, Marschall H 1995.Constituents of the leaf essential oil of *Hypericum perforatum* L. From India. Flavour Fragrance Journal,10: 365-370.

Yüce E 2016. Analysis of the Essential Oils of two *Hypericum* species (*H. lanuginosum* var. *lanuginosum* Lam. and *H. perforatum* L.) from Turkey. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 44: 29-34.

# Demir oksit ($Fe_2O_3$) nanopartiküllerinin genotoksisitesinin KOMET yöntemi ile araştırılması

Burçin Yalçın[1*], Merve Güneş[1], İbrahim Hakkı Ciğerci[2], Bülent Kaya[1]

[*1]Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Türkiye

[2]Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Afyon, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: byalcin@ogr.akdeniz.edu.tr

## Özet

Nanopartikül (NP) kaynaklı ürünlerin giderek çeşitlenmesi ve bu ürünlerin ekonomik, çevresel ve insan sağlığı yararına fayda sağlaması nedeni ile NP'lerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Ancak bu yoğun kullanım beraberinde bazı endişelerin oluşmasına da yol açmıştır. NP'ler kimyasal bileşimlerine, yapılarına, partikül büyüklüklerine, yüzey alanlarına ve şekillerine göre farklı toksik etkiler gösterebilmektedir. Şekilleri ve boyutları NP'lerin hücresel alımları ve potansiyel toksisitesinde önemli belirleyicilerdir. Bu çalışmada manyetik rezonans görüntülemede, *in vivo* uygulamalarda, ilaç dağıtımında, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu gibi birçok biyomedikal ve biyomühendislik alanlarında kullanıma sahip olan demir oksit ($Fe_2O_3$) NP'lerinin genotoksisitesinin partikül boyutu ile ilişkisini belirlemek amacıyla *Drosophila* hemositleri ile KOMET (alkali tek hücre jel elektroforez) analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda <50 nm ve <100 nm partikül boyutuna sahip $Fe_2O_3$ NP'leri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak her iki boyuta sahip $Fe_2O_3$ NP uygulamasında da çalışılan 3 farklı dozdan (1, 2 ve 5 mM) sadece 1 mM'lık uygulamada kontrol grubu distile suya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde genoksisitenin indüklendiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** KOMET, demir oksit, nanopartikül, genotoksisite, *Drosophila*.

## Investigation of genotoxicity of iron oxide ($Fe_2O_3$) nanoparticles by COMET method

## Abstract

The use of nanoparticles (NPs) has become widespread due to the increasing diversification of products from NP and the benefit of these products for economic, environmental and human health. However, this overutilize has also led to some concerns. NPs can show different toxic effects depending on their chemical composition, structure, particle size, surface area and shape. Their shape and size are important determinants in the cellular uptake and potential toxicity of NPs. In this study, COMET (alkaline single cell gel electrophoresis test) analysis was performed with *Drosophila* hemocytes to determine the genotoxicity of iron oxide ($Fe_2O_3$) NPs, which are used in many biomedical and bioengineering fields, such as magnetic resonance imaging, drug delivery, detoxification of biological fluids. In addition, the relationship between the genotoxicity of $Fe_2O_3$ NPs and the particle size was investigated using two different sizes of $Fe_2O_3$. As a result of the study, no statistically significant difference was found when $Fe_2O_3$ NPs with particle size of <50 nm and <100 nm were compared. However, in both $Fe_2O_3$ NP treatments (<50 and <100 nm), it was determined that only 1 mM dose (between 1, 2 and 5 mM) was induced statistically significant level of genoxicity compared to the control group distilled water.

**Keywords:** COMET, iron oxide, nanoparticle, genotoxicity, *Drosophila*.

## GİRİŞ

Metal oksit nanopartikülleri ticari, endüstriyel ve medikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan nanopartiküllerin (NP'lerin) bir sınıfıdır (Johnston ve ark., 2010; Ivask ve ark., 2015). En sık kullanılan temel metal oksit NP'leri; titanyum dioksit ($TiO_2$), seryum oksit ($CeO_2$), demir oksitler ($Fe_2O_3$, FeO, $Fe_3O_4$ vb), alüminyum oksit (AlO), silica ($SiO_2$) ve çinko oksit (ZnO)'dir (Ju-Nam ve Lead, 2008; Labille ve Bottero, 2010). Metal oksit NP'lerinin kullanım alanlarına baktığımızda ise kozmetikten, gıda paketlemeye, güneş pillerinden, ilaç taşınım sistemlerine pek çok alanı kapsadığı bilinmektedir (Ju-Nam ve Lead, 2008; Kumar ve ark., 2014). Bu farklı uygulamalarından dolayı metal oksit NP'lerine insan ve çevresel kaynaklı maruziyetin giderek artacağı düşünülmekte ve beraberinde yol açabileceği olumsuz etkiler konusunda endişelere yol açmaktadır (Ma ve ark., 2015; Scherer ve ark., 2019). Nanopartiküller oksidatif hasara neden olabilmekte ve

dolaylı olarak DNA'da hasar yaratabilmektedir. Bunun yanında yeterince küçük NP'ler nükleus porlarından geçerek DNA'ya ulaşabilmekte ve direkt olarak zarar verebilmektedir (Singh ve ark., 2009). Ayrıca partiküllerden salınan metal iyonları membran yapılarına zarar verebilmektedir. Lizozom membranında oluşacak hasar DNase gibi yıkıcı enzimlerin sitoplazmaya salınmasına neden olabilmekte bunun sonucunda da DNA'da kırıklar oluşabilmektedir (Karlsson 2010; Karlsson ve ark., 2015). Dolayısıyla, bu NP'lerin çevre ve canlı organizmalar üzerindeki risk değerlendirmesi hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için genotoksik değerlendirmesi oldukça önemlidir.

Metal oksit NP'lerinden biri olan demir oksit NP'lerinin fizyokimyasal özelliklerinden dolayı *in vivo* ve *in vitro* araştırmalar için yaygın bir uygulaması vardır (Sadeghi ve ark., 2014; Caro ve ark., 2019). 21. yy başlarından itibaren özellikle son 10 yıldır demir oksit NP'leri ile ilgili yayınlar artış göstermektedir (PubMed 2020). Aynı zamanda manyetik özellikleri nedeniyle de manyetik rezonans görüntüleme, ilaç veya genlerin hedefli verilmesi, doku mühendisliği, hedeflenen tümörün yok edilmesi, gibi pek çok çeşitli uygulamalarda benzersiz bir potansiyele sahiptir (Wu ve ark., 2012; Sadeghi ve ark., 2014; Katz, 2019; Reddy ve ark., 2019; Yousef ve ark., 2019). Demir oksit NP'lerinin nano boyutlarda olması onları özellikle onkoloji tedavilerinde kullanımı için önemli adaylardan biri haline getirse de küçük boyutlarda olması özellikle kan beyin bariyerini aşabilme ve biyolojik sistemlerde oksidatif stres oluşturma, nükleer zara hasar vererek mutasyonlara yol açma risklerini de ortaya çıkarmaktadır (Wu ve ark., 2012; Chen ve ark., 2015; Dahman, 2019). Ancak literatürdeki çalışmalara bakıldığında demir oksit NP'lerinin toksikolojik değerlendirmesi ile ilgili kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Bu bağlamda demir oksit ($Fe_2O_3$) NP'lerinin genotoksisitesini araştırmak ve partikül boyutu ile ilişkisini belirlemek amacıyla *Drosophila* hemositleri ile KOMET (alkali tek hücre jel elektroforez) analizi gerçekleştirilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada $Fe_2O_3$ NP'lerinin iki farklı boyutunun (<50 ve <100 nm) genotoksik etkisini araştırmak için *Drosophila melanogaster* larvaları üzerinde yapılan ön uygulamalarla belirlenen toksik etki göstermeyen 3 farklı (1, 2 ve 5 mM) dozu çalışılmıştır. NP'lerin genotoksik potansiyeli *Drosophila* hemositlerinde alkali tek hücre jel elektroforez testi (KOMET) ile belirlenmiştir.

### Kimyasallar

<50 nm ve <100 nm olmak üzere iki farklı partikül boyutuna sahip demir oksit NP'leri ($Fe_2O_3$ NP, Cas No:1309-37-1) ve pozitif kontrol grubu olarak kullanılan etil metan sülfonat (EMS, Cas No: 62-50-0) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

### Nanopartikül Karakterizasyonu

Kullanılan NP'lerin partikül boyutları JEOL 2100F HRTEM Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında görüntülenmiştir.

### *Drosophila melanogaster*

Bu çalışmada KOMET yönteminde *Drosophila* Oregon $R^+$ hattı kullanılmıştır. Hatlar standart *Drosophila* besiyerinde (Lewis besini: mısır unu, şeker, maya, agar, asit karışımı) (Lewis ve Bacher, 1968), 25 ± 1 °C ve % 60 bağıl neme sahip ortamda idame ettirilmiştir. *D. melanogaster*, kısa hayat döngüsü, basit bir şekilde kültüre edilmesi, yüksek üreme potansiyeline sahip olması gibi avantajlarından dolayı genetik çalışmalarda kullanım açısından ideal bir model organizmadır. Ayrıca memeliler ile moleküler, hücresel, gelişimsel ve hastalık süreçleri bakımında da yüksek benzerlik göstermektedir (Reiter ve ark., 2001; Posgai ve ark., 2011; Pandey ve ark., 2013; Siddique ve ark., 2015; Alaraby ve ark., 2016).

### *Drosophila* Hemositlerinde Alkali Tek Hücre Jel Elektroforez Testi (KOMET)

KOMET testi, ökaryotik hücrelerde farklı bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan hızlı, basit, ucuz, güvenilir ve hassas bir tekniktir ve genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Singh ve ark., 1988; Mukhopadhyay ve ark., 2004; Shukla, 2011; Güneş ve ark., 2018; Ertuğrul ve ark., 2020). Bu çalışmada KOMET yönteminde *Drosophila* Oregon $R^+$ hattı kullanılmıştır. Yeterli miktarda çoğaltılan *Drosophila* Oregon $R^+$ hatlarından yeni taze besinlerde 8 saat boyunca yumurta toplanmıştır. Toplanan bireyler 72 ± 4 saatlik larval evreye ulaştıklarında iki farklı boyuttaki $Fe_2O_3$ NP'lerinin 3 farklı konsantrasyonlarına (1, 2 ve 5 mM) maruz bırakılmıştır. NP maruziyeti larvaların hazırlanan farklı dozlardaki NP'lerin 9 ml'si ile ıslatılan 4,5 gramlık hazır *Drosophila* instant medium besi yerine aktarılması ile gerçekleştirilmiştir. 24 saat maruziyetin ardından larvalar 96 ± 4 saatlik olduklarında elek yardımı ile çeşme

suyu altında yıkanarak instant medium'dan ayrılması sağlanmış ve %5 sodyum hipoklorid çözeltisinde steril edilmiştir. *Drosophila* larvalarından hemositler Irving ve ark. (2005) metoduna göre toplanmıştır. Her bir uygulama için 40-60 larva seçilerek stereo mikroskop altında iki ince uçlu pens yardımı ile içerisinde %0.07 feniltiyoüre bulunan fosfat bufer saline (PBS) solüsyonu içerisine hemositler toplanmıştır. Hemosit izolasyonundan sonra 300 g'de (10 dk 4°C) santrifüj edilerek elde edilen pellet üzerine soğuk PBS (20 µl) eklenmiştir. Sonra hemositler 80 µl düşük erime ısısına sahip agar (LMA, %0.75) ile karıştırılıp 100'er µl olacak şekilde bir gün önceden normal erime ısısına sahip agar (NMA, %1) ile kaplanmış olan lamlar üzerine yayılarak lamel ile kapatılmıştır. 10 dk buz üzerinde bekletildikten sonra lameller dikkatli bir şekilde çıkartılarak lamlar üzerine tekrar 80 µl LMA eklenerek lamel ile kapatılmış ve 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Süre sonunda lameller çıkartılmış ve lamlar taze lysis solüsyonuna (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM $Na_2EDTA$, %1 Triton X-100 ve %1 N-lauroyl sarcosinate, pH 10) konularak 1-16 saat 4 °C'de karanlık ortamda bekletilmiştir. Lysis aşamasından sonra lamlar soğuk elektroforez tamponu (1 mM $Na_2EDTA$ ve 300 mM NaOH, pH >13) içerisine alınarak 30 dk bekletilmiş ve sonra hücreler aynı tampon içerisinde 30 dk 25 V 300 mA'de yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra elektroforezden alınan lamlar 400 mM Tris solüsyonu (pH 7.5) içerisinde 5 dk bekletilmiş ve aynı işlem 2 kez daha tekrar edilerek nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak da lamlar 50 µL EtBr (60 µg / mL) ile boyanmıştır. Elde edilen preparatlarda her bir uygulama için rasgele 50 hücre olmak üzere 40X büyütmede floresan mikroskop (Nikon Eclipse E200) altında KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm şeklinde ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde kuyruk uzunluğu (µm), kuyruk yoğunluğu (%DNA) ve kuyruk momenti (iki parametrenin kombinasyonu) parametreleri değerlendirilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol grubu olarak 4 mM EMS kullanılırken, negatif kontrol grubu olarak da $Fe_2O_3$ NP'lerin çözücüsü olan ve konsantrasyonları hazırlanırken kullanılan distile su kullanılmıştır.

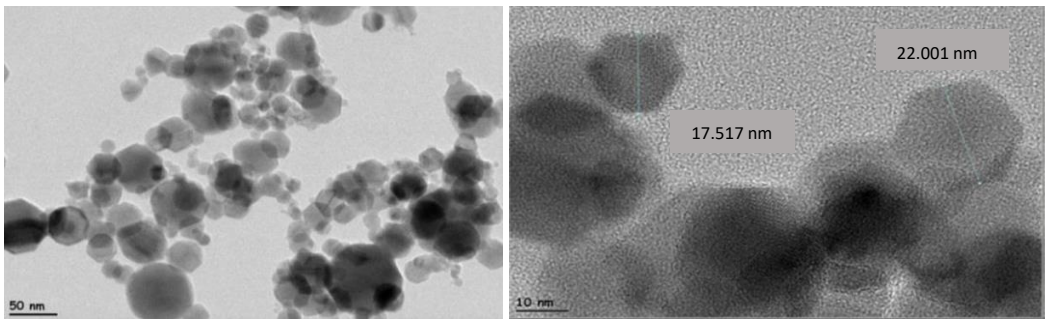
### İstatistiksel Analiz

KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçümü sonrasında elde edilen sonuçlar IBM SPSS Statistics 23 paket programı ile One-way ANOVA (Dunnet testi) kullanılarak değerlendirilmiştir.

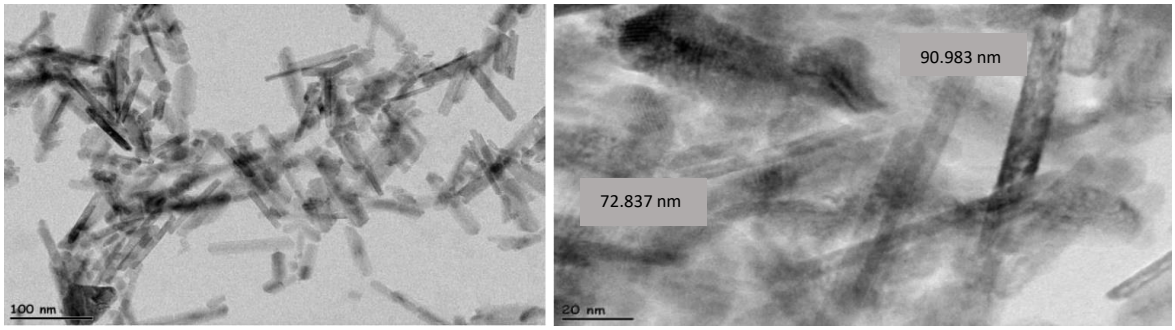
## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Nanopartikül Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan $Fe_2O_3$ NP'lerin partikül boyutlarının TEM ile karakterizasyonu sonucunda elde edilen TEM görüntüleri Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. Analiz sonuçlarına göre <50 nm $Fe_2O_3$ NP'lerinin partikül boyutu yaklaşık 15-25 nm olarak ölçülmüş, <100 nm $Fe_2O_3$ NP'lerinin partikül boyutu ise yaklaşık olarak 70-90 nm olarak ölçülmüştür.




**Şekil 1.** <50 nm $Fe_2O_3$ NP'nin Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüsü

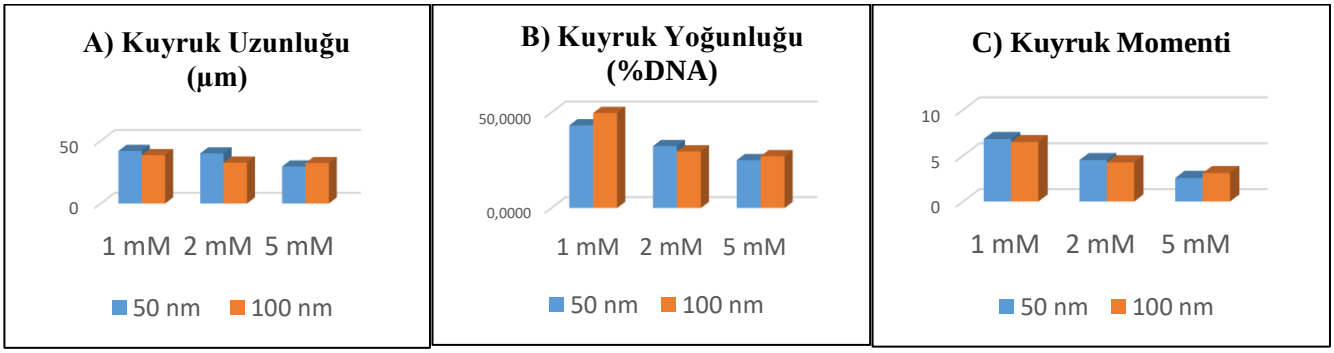



**Şekil 2.** <100 nm $Fe_2O_3$ NP'nin Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüsü

### *Drosophila* Hemositlerinde KOMET Testi

NP'ler kimyasal bileşimlerine, kimyasal yapılarına, partikül büyüklüklerine, yüzey alanlarına ve şekillerine göre farklı toksik etkiler gösterebilmektedir (Xia ve ark., 2008; Rosenkranz ve ark., 2012). Şekilleri ve boyutları NP'lerin hücresel alımları ve potansiyel toksisitesinde önemli belirleyicilerdir. Çünkü NP'lerin küçük boyutlara sahip olması onların aynı zamanda aynı boyut aralığına sahip olduğu DNA ile etkileşime girerek farklı tepkiler verebilmesine yolaçabilmektedir (Shatkin, 2013). NP'lerin toksisitesine bakıldığında bu partiküllerin indüklediği toksik ve genotoksik mekanizmaların sadece DNA ile etkileşime geçerek değil ayrıca mitozda görev alan proteinleri etkileyerek, ROS (reaktif oksijen türleri) üreterek ve hücrelerdeki antioksidan bariyerinin (SOD ve Glutatyon) kırılmasına neden olarak da gerçekleşebilmektedir (Carmona ve ark., 2015; 2016). NP'lerin küçük boyutu büyük yüzey alanına sahip olmalarına yol açmakta ve bu da NP'leri biyolojik olarak daha aktif hale getirmektedir. Parçacı yüzey kimyası doğrudan ROS oluşumuna neden olabilmektedir (Singh ve ark., 2016a). Bu nedenle ROS üretimi ve oksidatif stres hasarı NP toksisitesi için bir paradigma haline gelmiştir (Xia ve ark, 2008). ROS, DNA hasarı, gen mutasyonu, MN (mikronükleus), kromozom bozuklukları gibi olaylarla genotoksisiteye neden olabilmektedir (Kumari ve ark., 2014).Özellikle son yıllarda teknolojinin gelişmesiyle değişen yaşam stili sonucunda, yaygın olarak hayatımıza dâhil olan ve insan sağlığı üzerine potansiyel etkileri hâlâ büyük ölçüde bilinmeyen NP'lerin, çeşitli yöntemler ve model organizmalar kullanılarak farklı etkilerinin saptanması gerekmektedir. Bu nedenlerle, son yıllarda pek çok alanda çeşitli amaçlarla kullanılan NP'lerden $Fe_2O_3$ NP'lerinin KOMET yöntemi ile *in vivo* olarak genotoksisitesinin değerlendirilmesi önemlidir.

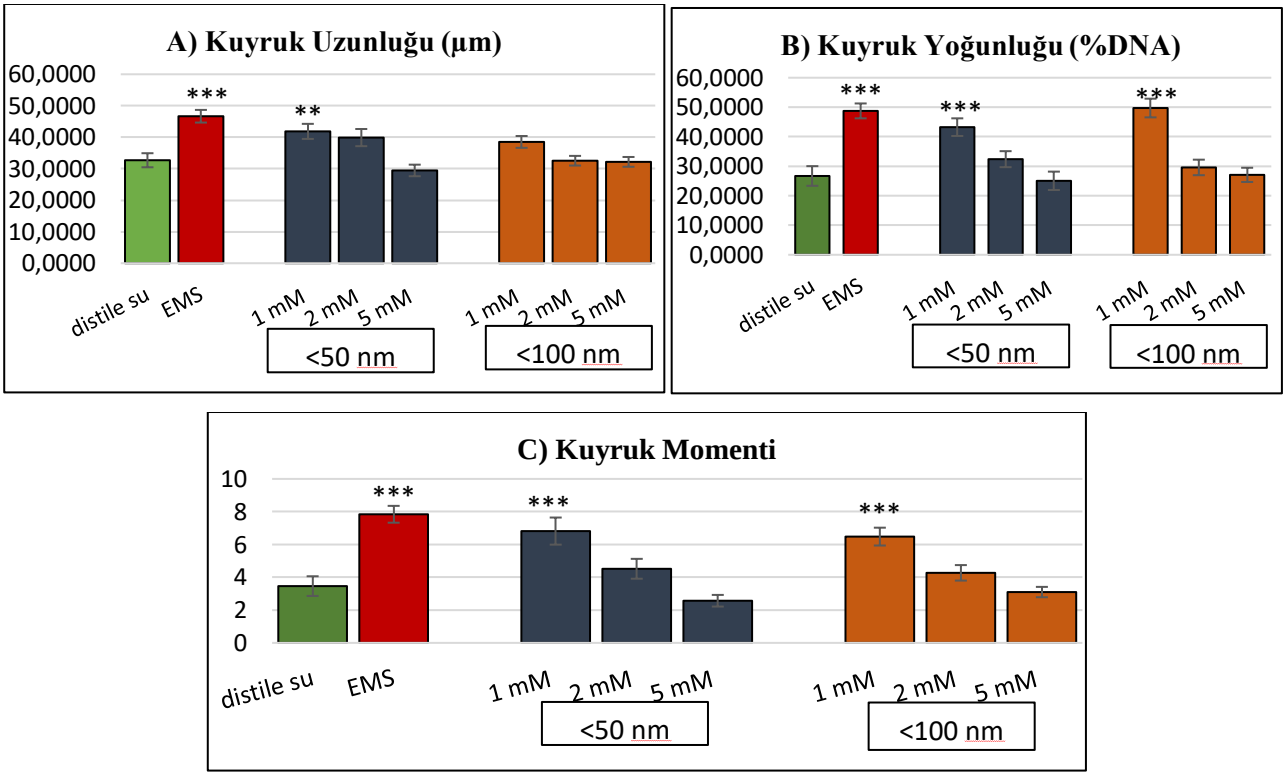
Bu çalışmada *Drosophila* hemositlerinde alkali jel elektroforez testi (KOMET) ile genotoksik potansiyelleri değerlendirilen $Fe_2O_3$ NP'lerinin uygulamalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3 ve 4'de gösterilmiştir. Çalışma sonucunda $Fe_2O_3$ NP'lerinin <50 nm ve <100 nm olmak üzere farklı boyutlarının kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ölçüm sonuçları (Şekil 3 A, B ve C) karşılaştırıldığında <50 nm boyutundaki $Fe_2O_3$ NP'lerinin <100 nm boyutuna göre DNA hasarını arttığı görülmektedir ancak oluşan hasarın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılığa neden olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.




**Şekil 3.** $Fe_2O_3$ NP'lerinin farklı partikül boyutlarının (<50 ve <100 nm) DNA hasar karşılaştırılması.

Uygulanan NP'lerin her boyutunun kendi içerisinde farklı konsantrasyonları (1, 2 ve 5 mM) karşılaştırıldığında ise çalışılan en düşük dozda (1mM) DNA hasarının tüm parametreler açısından (kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti) kontrol grubu distile suya göre anlamlı düzeyde indüklendiği görülmüştür (Şekil 4).

Doz toksisiteyi belirleyen en temel faktörlerdendir. Uygun dozda kullanılmadığı taktirde her madde olumsuz etkiler meydana getirebilmektedir. Ancak burada çalışma sonucunda uygulanan doz artıkça oluşan DNA hasarının azaldığı görülmektedir. Doz arttıkça birim hacimdeki çözeltideki $Fe_2O_3$ NP'lerin miktarı/yoğunluğu artmakta ve kümeleşerek çökelme eğilimi göstermektedir (Honary ve Zahir, 2013; Singh, 2016b). Yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi uygulanan NP'lerin agrega olarak kümeleştiği ve buna bağlı partikül boyutunun artması ile birlikte hücreye girişinin zorlaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 1 mM'da meydana gelen etki de, demir oksit NP'lerinin geniş yüzey alanından dolayı yüksek miktarda $Fe^{2+}$ / $Fe^{3+}$ iyonu oluşması ile açıklanabilir. Serbest kalan iyonlar, farklı serbest radikallerin oluşumununa neden olabilmektedir. Demir iyonlarının salınması ile hücre zarları hasara uyrayabilir ve lipitleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine yol açabilmektedir (Cassee ve ark., 2011; Oberdörster ve ark., 2005; Horie ve ark., 2012; Abakumov ve ark., 2018).




**Şekil 3.** KOMET yönteminde *Drosophila* hemositlerinde $Fe_2O_3$ NP'leri uygulamasından sonra meydana gelen DNA Hasarı

Literatürdeki $Fe_2O_3$ NP'leri ile ilgili çalışmalara bakıldığında çalışmamızı destekler nitelikte yayınlar bulunmaktadır. Yousef ve ark. (2019) yetişkin erkek Wistar ratları ile yaptıkları araştırma sonucunda $Fe_2O_3$ NP'lerinin belirgin DNA fragmentasyonuna, mtTFA down-regülasyonuna, PGC-1α ekspresyonunun up-regülasyonuna, asetilkolin esteraz, norepinefrin, serotonin, dopamin ve antioksidan enzimlerinde düşüşe, lipit peroksidasyonu, nitrik oksit, tümör baskılayıcı gen p53, tümör nekroz faktörü-α, interlökin-6, asetilkolin ve norepinefrinde artışına neden olarak farklı yollarla nörotoksisite ve inflamasyona neden olduğunu saptamışlardır. Wu ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *C. elegans* üzerinde DMSA (dimercaptosuccinic asit) kaplı $Fe_2O_3$ NP'lerinin gelişim ve davranış hareketleri üzerine etkileri ve ROS üretimine etkisini araştırmışlardır. L4 evre larvalara 24 saat maruziyetten ve L1 evreden erişkinliğe kadar süren maruziyetten sonra sırasıyla 50 µg/L ve 500 µg/L'nin üzerindeki konsantrasyonlarda nematodlar üzerinde gelişim, üreme ve hareket davranışlarında bozukluklara ve ROS üretiminde artışa yol açtığını saptamışlardır. $Fe_2O_3$ NP'lerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada 28 gün boyunca haftada 1 kez maruz bırakılan Wistar ratlarında antioksidan enzim aktivitesi (SOD, CAT ve GSH) doza bağlı inhibisyonuna ve MDA seviyesinde doza bağlı artışa yol açarak oksidatif strese yol açtığı bulunmuş ancak bizim çalışmamızın aksine KOMET yöntemi ile önemli bir DNA hasarına yol açmadığını bulmuşlardır (Gaharwar ve Paulraj, 2015). Alarifi ve ark. (2014) insan meme kanseri hücrelerinde MTT testi, laktat dehidrogenaz (LDH) testi ve KOMET yöntemi ile $Fe_2O_3$ NP'lerinin etkilerini araştırdıkları çalışmada konsantrasyon ve zamana bağlı olarak ROS üretiminde ve lipit peroksidasyonunda artış ve SOD, GSH ve CAT aktivitelerinde azalma ile oksidatif stresin indüklendiğini bulmuşlardır. Benzer şekilde KOMET yöntemi sonucuna göre DNA hasarında doza ve zamana bağlı artışın olduğu ve Kaspaz-3 aktivitesi indüklendiğini göstermişler böylece DNA hasarının oksidatif stres kaynaklı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Başka bir çalışmada HepG2 (insan karaciğer kanseri) hücre hattı üzerinde $Fe_2O_3$ NP'lerinin MTT ve LDH testleri ile sitotoksik etkisini araştırmışlar ve hücre canlılığının doza bağlı bir şekilde azaldığını ve ROS üretiminin arttığını saptamışlardır ayrıca fosforile H2AX ölçümü ile DNA hasarı değerlendirilmiş doza ve zaman bağlı olarak DNA fragmentasyonunda önemli düzeyde artışın olduğunu bulmuşlardır (Sadeghi ve ark., 2014). Wang ve ark. (2010) erkek Wistar ratlarında inhalasyon yolu ile $Fe_2O_3$ NP'lerine maruziyetin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 3 gün boyunca günde iki kez 8.5 mg / kg vücut ağırlığında maruziyet gerçekleştirmişler ve alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalin fosfataz, toplam protein, kreatin kinaz ve laktat dehidrojenaz seviyelerinde önemli ölçüde azalma tespit etmişler ayrıca karaciğer ve akciğer dokularında ciddi hasara neden olduğunu saptamışlardır. Singh ve ark.

(2013) dişi Wistar ratlarında 30 nm ve bulk formdaki $Fe_2O_3$ NP'lerinin 500, 1000, 2000 mg/kg vücut ağırlığında maruziyet sonucunda genotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada her iki $Fe_2O_3$ NP'lerinin de lökositlerde KOMET yöntemi, periferik kan hücrelerinde MN testi ve kemik iliği hücrelerinde CA testi sonuçlarına göre DNA hasarı, MN ve CA frekanslarında tüm dozlarda istatistiksel olarak artışa yol açmadığını saptayarak bizim çalışmamızın aksine genotoksik potansiyelinin olmadığını tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada yetişkin erkek Wistar ratlarında pulmoner inhalasyon yolu ile $Fe_2O_3$ NP'lerinin akciğer dokusu üzerine etkileri araştırılmıştır ve doza bağlı olarak akciğer dokusunda serbest radikallerin belirgin şekilde arttığını ve GSH'nin azaldığını saptamışlardır. Ayrıca histolojik çalışmalar sonucunda da akciğerlerde amfizem, interstisyel hipertermi ve inflamasyonun oluştuğunu bulmuşlardır (Sadeghi ve ark., 2015).

## SONUÇ

Nanoteknoloji endüstrisi yaşam kalitesini yükseltmek için her geçen gün yeni ürünler ortaya koyarken bu ürünlerin yaratabileceği potansiyel toksisitesinin de araştırılmasının önemi göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmada indüklenen genotoksisitenin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için moleküler düzeyde çalışmaların yapılması etki mekanizmaların aydınlatılması bakımından da önemli olacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan $Fe_2O_3$ NP'leri Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 13.FENBİL.22 numaralı projeden temin edilmiştir.

## KAYNAKLAR

Abakumov MA, Semkina AS, Skorikov AS, Vishnevskiy DA, Ivanova AV, Mironova E, Davydova GA, Majouga AG, Chekhonin VP. 2018. Toxicity of iron oxide nanoparticles: Size and coating effects. J Biochem Mol Toxicol. 2018;e22225.

Alaraby M, Annangi B, Marcos R, Hernández A. 2016. Drosophila melanogaster as a suitable in vivo model to determine potential side effects of nanomaterials: A review. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 19(2):65-104.

Alarifi S. et al 2014. Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress, DNA Damage, and Caspase Activation in the Human Breast Cancer Cell Line Biological Trace Element Research, 159: 416-24.

Carmona ER, Inostroza-Blancheteau C, Rubıo L, Marcos R. 2015. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Drosophila melanogaster. Mutation Research (GTEM), 791:1-11.

Carmona ER, Inostroza-Blancheteau C, Rubio L, Marcos R. 2016. Genotoxic and oxidative stres potential of nanosized and bulk zinc oxide particles in Drosophila melanogaster, Toxicology and Industrial Health. 32(12):1987-2001

Caro C, Egea-Benavente D, Polvillo R, Royo JL, Leal MP, Garcia-Martin ML. 2019. Comprehensive Toxicity Assessment of PEGylated Magnetic Nanoparticles for in vivo applications. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 177, 253–259.

Cassee FR, Van Balen EC, Sıngh C, Green D, Muıjser H, Weınsteın J. and Dreher K. 2011. Exposure, Health and Ecological Effects Review of Engineered Nanoscale Cerium and Cerium Oxide Associated with its Use as a Fuel Additive. Critical Reviews in Toxicology, 41(3): 213–229.

Chen H, Wang B, Feng W, Du W, Ouyang H, Chai Z, Bi X. 2015. Oral magnetite nanoparticles disturb the development of Drosophila melanogaster from oogenesis to adult emergence. Nanotoxicology, 9(3):302-312.

Dahman Y. 2019. Biomaterials Science and Technology Fundamentals and Developments. Boca Raton : Taylor & Francis.

Gaharwar US and Paulraj R. 2015. Iron Oxide Nanoparticles Induced Oxidative Damage in Peripheral Blood Cells of Rat. Journal of Biomedical Science and Engineering, 8: 274-286.

Güneş M, Yalçın B, Ertuğrul H, Kaya B. 2018. Ascorbic Acid Ameliorates Genotoxic Effects of Cobalt Nanoparticles and Cobalt Chloride in in vivo Drosophila Assays. Fresenius Environmental Bulletin, 27:2380-2391.

Ertuğrul H, Yalçın B, Güneş M, Kaya B. 2020. Ameliorative effects of melatonin against nano and ionic cobalt induced genotoxicity in two in vivo Drosophila assays. Drug and Chemical Toxicology, 43 (3): 279-286.

Honary S, Zahir H. 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 12 (2):265-273.

Horie M, Fujıta K, Kato H, Endoh S, Nıshıo K, Komaba LK, Nakamura A, Mıyauchı A, Kınugasa S, Hagıhara Y. et al. 2012. Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface areaw. Metallomics, 4: 350–360.

Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, Hoffmann JA, Hetru C, Meister M. 2005. New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis. Cell Microbiol., 7, 335-350.

Ivask A, Tıtma T, Vısnapuu M, Vıja H, Käkınen A, Sıhtmäe M, Pokhrel S, Mädler L, Heınlaan M, Kısand V. et al. 2015. Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types in vitro. Current Topics in Medicinal Chemistry, 15: 1-16.

Johnston BD, Scown TM, Morger J, Cumberland SA, Baalousha M, Linge K, Van Aerle R, Jarvis K, Lead JR, Tyler CR, 2010. Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO2, CeO2, and ZnO to fish. Environ. Sci. Technol. 44 (3):1144–1151.

Ju-Nam Y, Lead JR. 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Science of The Total Enviroment. 400:396–414.

Karlsson HL, Di Bucchianico S, Collins AR, Dusinska M. 2015. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? Environmental and Molecular Mutagenesis. 56 (2):82-96.

Karlsson HL. 2010. The comet assay in nanotoxicology research. Anal Bioanal Chem. 398(2):651-66.

Katz E. 2019. Synthesis, Properties and Applications of Magnetic Nanoparticles and Nanowires—A Brief Introduction. Magnetochemistry, 5 (61).

Kumar A, Khan S. and Dhawan A. 2014. Metal Oxide Nanoparticles Elicit Genotoxic Responses in Mammalian Cells : A Critical Review. In: Prof. A. Misra and Prof. J. Bellare, Nanoscience and Technology for Mankind, Humana Press, pp. 160-194, India.

Kumari M, Kumarı SI and Grover P. 2014. Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. Mutagenesis, 29 (6): 467–479.

Labille J. and Bottero J-Y. 2010. Fate of Nanoparticles in Aqueous Media. In: P. Houdy, M. Lahmani and F. Marano (Editors), Nanoethics and Nanotoxicology. Springer, pp. 291- 324, France.

Lewis EB, Bacher F. 1968. Methods of feeding ethylmethanesulfonate (EMS) to Drosophila males. Drosophila Information Service, 43, 193.

Ma H, Diamond S, Hinkley G, Roberts SM, 2015. Nanotoxicology, in: Roberts, S.M., James, R.C., Williams, P.L. (Eds.), Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications, third ed., John Wiley & Sons, Canada, pp. 359-372.

Mukhopadhyay I, Chowdhuri DK, Bajpayee M and Dhawan A. 2004. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in Drosophila melanogaster using the alkaline comet assay. Mutagenesis, 19:85-90.

Oberdorster G, Oberdorster E. and Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental Health Perspectives, 113 (7): 823-839.

Pandey A, Chandra S, Chauhan LKS, Narayan G, Chowdhuri DK, 2013. Cellular internalization and stress response of ingested amorphous silica nanoparticles in the midgut of Drosophila melanogaster. Biochimica et Biophysica Acta. 1830 (1):2256–2266.

Posgai R, Ahamed M, Hussain SM, Rowe JJ, Nielsen MG. 2009. Inhalation method for delivery of nanoparticles to the Drosophila respiratory system for toxicity testing. Science of the Total Environment, 408:439–443.

PubMed 2020. Iron oxide nanoparticle, Results by year. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=iron+oxide+nanoparticles [31.03.2020]

Reddy KR, Reddy PA, Reddy CV, Shetti NP, Babu B, Ravindranadh K, Shankar MV. Reddy MC, Soni S, Naveen S. 2019. Functionalized magnetic nanoparticles/biopolymer hybrids: Synthesis methods, properties and biomedical applications. Chapter 10. Methods in Microbiology, Volume 46, Pages 227-254.

Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. 2001. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In Drosophila melanogaster. Genome Res., 11(6):1114-25.

Rosenkranz P, Fernández-Cruz ML, Conde E, Ramírezfernández MB, Flores JC, Fernández M. and Navas JM. 2012. Effects of cerium oxide nanoparticles to fish and mammalian cell lines: Anassessment of cytotoxicity and methodology. Toxicology in vitro, 26: 888–896.

Sadeghi L, Tanwir F, Babadi VY. 2014. In vitro toxicity of iron oxide nanoparticle: Oxidative damages on HepG2 cells. Experimental and Toxicologic Pathology 67(2):197-203.

Sadeghi L, Yousefi Babadi V, Espanani HR.2015. Toxic effects of the Fe2O3 nanoparticles on the liver and lung tissue. Bratisl Lek Listy. 116 (6):373 – 378.

Scherer MD, Sposito JCV, Falco WF, Grisolia AB, Andrade LHC, Lima SM, Machado G, Nascimento VA, Gonçalves DA, Wender H, Oliveira SL, Caires ARL. 2019. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of Allium cepa roots: A close analysis of particle size dependence. Science of the Total Environment, 660:459–467.

Shatkin JA. 2013. Nanotechnology Health and Environmental Risks, Second Edition. CRC Press Taylor&Francis Group, pp. 1-30, New York.

Shukla AK, Pragya P and Chowdhuri D. 2011. A modified alkaline Comet assay for in vivo detection of oxidative DNA damage in Drosophila melanogaster. Mutation Research, 726:222-6.

Siddique YH, Haidari M, Khan W, Fatima A, Jyoti S, Khanam S, Naz F, Rahul Ali F, Singh BR, Beg T, Mohibullah, Naqvi AH, 2015. Toxic potential of copperdoped ZnO nanoparticles in Drosophila melanogaster (Oregon R). Toxicol Mech Methods. 25 (6):425-32.

Singh AK. 2016a. Structure, Synthesis, and Application of Nanoparticles. In: A.K. Singh (Editor), Engineered Nanoparticles Structure-Properties and Mechanisms of Toxicity, Elsevier, pp. 19-76, USA.

Singh AK. 2016b. Mechanisms of Nanoparticle Toxicity. In: A.K. Singh (Editor), Engineered Nanoparticles Structure-Properties and Mechanisms of Toxicity, Elsevier, pp. 295-341, USA.

Singh N, Manshıan B, Jenkıns GJS, Grıffıths SM, Wıllıams PM, Maffeıs TGG, Wrıght CJ and Doak SH. 2009. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials, 30:3891–3914.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175:184-91.

Singh SP. et al 2013. Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. Toxicology and Applied Pharmacology, 266: 56–66.

Wang L. et al 2010. Acute Toxicity of Ferric Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Rats. Journal of Nanoscience and Nanotechnology Vol. 10:8617–8624

Wu Q, et al 2012. Evaluation of Environmental Safety Concentrations of DMSA Coated Fe2O3-NPs Using Different Assay Systems in Nematode Caenorhabditis elegans. Plos One, 7: 43729.

Xia T, Kovochıch M, Lıong M, Mädler L, Gılbert B, Shı H, Yeh JI, Zınk JI. and Nel AE. 2008. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. ACS Nano, 2 (10): 2121-2134.

Yousef MI, Abuzreda AA. and El-Nabi Kamel MA.2019. Neurotoxicity and inflammation induced by individual and combined exposure to iron oxide nanoparticles and silver nanoparticles. Journal of Taibah University for Science, 13(1):570-578.

# Meyve asitleriyle zenginleştirilmiş çavdar unu bazlı yenilebilir film üretim ve karakterizasyonu

Nurcennet ERTÜRK, Suzan BİRAN AY*, Emir Zafer HOŞGÜN, Berrin BOZAN

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 26555 Eskişehir, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: suzanba@eskisehir.edu.tr

## Özet

Yenilebilir film ve kaplamalar gıdaların raf ömürlerini uzatarak bozunmasını geciktiren, gıda ile birlikte tüketilebilen dış tabaka ambalajı olarak bilinmektedirler. Doğal bozunurluğu yüksek olmasından dolayı çevresel sorunları ortaya çıkarmayan yenilebilir filmlerde ana materyal olarak polisakkarit, protein ve/veya lipit bazlı biyopolimerler kullanılmaktadır. Filmin mekanik, kimyasal ve antimikrobiyal özelliklerini güçlendirmek amacıyla, filme çözücü, plastikleştirici ve fonksiyonel katkı maddeleri de eklenmektedir. Bu çalışmada düşük maliyetli ve piyasada kolay bulunabilen çavdar unundan yenilebilir film üretimi amaçlanmış; plastikleştirici derişiminin film kalitesine etkisi incelenmiş ve tannik, tartarik, suksinik ve gallik asit gibi meyve asitleriyle zenginleştirmenin filmlerin antimikrobiyal özelliğine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda literatürde az kullanılan plastikleştirici seçilmiş ve farklı konsantrasyonlarda kullanılarak film üretimi yapılmıştır. Daha sonra hazırlanan yenilebilir filmlerin görsel (opaklık), yapısal (TGA), mekanik (kalınlık, yüzde uzama ve çekme mukavemeti), su buhar geçirgenliği, suda çözünürlük ve antimikrobiyal aktivite gibi özellikleri incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında %5 (w/v) çavdar unu farklı derişimlerde sorbitol (%30-100 (w/w un)) ile suda karıştırılmış ve yarım saat pişirildikten sonra karışım petri kaplarına aktarılmıştır. Dökme yayma yöntemiyle oluşturulan bu filmlerin kalınlık değerleri 0,15 ile 0,2 mm arasında değişkenlik göstermiştir. Filmlerin suda çözünürlüğü % 62-84 arasında bulunmuştur. Mekanik test analizlerinde yenilebilir filmlerin kopma anındaki mukavemet değerlerinin 0,71-4,88 MPa ve uzama değerlerinin % 4-46 aralığında çıkmıştır. En yüksek mukavamet değerleri %40 sorbitol ile hazırlanan filmde olduğu tespit edilince çalışmanın ikinci aşamasında %5 (w/w un) tannik, tartarik, suksinik ve gallik asit ilave edilerek filmler hazırlanmıştır. Hazırlanan filmlerin su buhar geçirgenlikleri 0,59 ile 0,71 ng $m^{-1}$ $s^{-1}$ $Pa^{-1}$ arasında değişim göstermiştir. Ayrıca meyve asitli filmlerde *Salmonella typhimurium* üzerinde antimikrobiyal etki gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** yenilebilir film, çavdar unu, sorbitol, meyve asitleri, antimikrobiyal etki

# Production and characterization of rye flour based edible films enriched with fruit acids

## Abstract

Edible films and coatings are known as outer layer packagings that can be consumed with food, delaying is degradation and extending its shelf life. Polysaccharide, protein and / or lipid-based biopolymers are used as the main material in edible films. They do not cause environmental problems due to their high natural degradability. In order to improve the mechanical, chemical and antimicrobial properties of the film, a solvent, plasticizer and functional additives are also added to the film. In this study, it was aimed to produce edible films from rye flour, which is cheap and easily available in the market. The effect of plasticizer concentration on film quality was examined and it was aimed to determine the antimicrobial properties of films enriched with fruit acids such as tannic, tartaric, succinic and gallic acid. For this purpose, an infrequently used plasticizer was selected and films were produced using different concentrations of plasticizer. Then the characterization of these edible films was performed by examination of their visual (opacity), structural (TGA) and mechanical (thickness, elongation and tensile strength), properties, as well as - water vapor permeability, water solubility and antimicrobial activity. In the first stage of the study, 5% (w / v) rye flour in water was mixed with sorbitol (30-100% (w / w flour)) and after cooking for half an hour, the mixture was transferred to

petri dishes. The thickness values of these films created by solvent casting method varied between 0.15 and 0.2 mm. The water solubility of the films ranged between 62-84%. In mechanical test analysis, the strength values of edible films at the moment of breakage were 0.71-4.88 MPa and the elongation values were in the range of 4-46%. Since the films prepared with 40% sorbitol exhibited the highest mechanical strength, in the second stage of the study, plasticizer concentration was fixed to that value. Enriched films were prepared by addition of 5% (w / w flour) tannic, tartaric, succinic and gallic acid. The water vapor permeability of the prepared films varied between 0.59 and 0.71 ng $m^{-1}$ $s^{-1}$ $Pa^{-1}$. In addition, antimicrobial effects on *Salmonella typhimurium* were observed in fruit acid containing films.

**Keywords:** edible film, rye flour, sorbitol, fruit acids, antimicrobial effect

## GİRİŞ

İnsan nüfusunun artış göstermesiyle beslenme konusundaki beklentiler de artmıştır. Bu beklentiye karşılamak amacıyla gıdaların raf ömrünü uzatmak, tazeliğini, kalitesini ve bütünlüğünü korumak amacıyla çeşitli ambalajlama teknikleri geliştirilmiştir (Candan & Bağdatlı, 2018). Yenilebilir film ve kaplamalar, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve gıda ile tüketilebilinen dış tabaka olarak tanımlanabilmektedir (Yıldız & Yangilar, 2016). Yenilebilir filmler hidrokolloid, lipit ve kompozit (hidrokolloid+lipit) bazlı filmler olmak üzere üçe ayrılır. Hidrokolloidler, proteinler ve polisakkaritler gibi hidrofilik polimerleri içerir. Protein kazein, peynir altı suyu, kollajen, glüten, zein vb. gibi alt kategorilerden oluşmaktadır. Polisakkaritlere ise patates, mısır, buğday nişastası, selüloz ve türevleri, gamlar, kitosan gibi materyaller örnek verilebilir. Lipitlere de mumlar ve yağ asitleri örnek verilir. Hidrokolloid ve lipitlerden oluşan bileşiklere kompozit adı verilir (Kocakulak, Sumnu, & Sahin, 2019).

Yenilebilir ambalajlar gıda ile birlikte tüketilebilir olması, yenilebilir maddelerden üretildikleri için doğada hızlı şekilde parçalanabilir olması ve raf ömrünü uzatması gibi yararları bulunmaktadır. Ancak petrol türevli materyallere göre daha az fiziksel ve kimyasal dirence sahip olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Yıldız & Yangilar, 2016) (Bahtimur & Tanyolaç, 2018).

Un ile hazırlanan yenilebilir filmler, kompozit filmler olarak kabul edilir (Kocakulak, Sumnu, & Sahin, 2019).Literatürde patlıcan,pirinç,muz,mısır,ceviz ve nohut unu vb. gibi un esaslı yenilebilir film ile çalışmalar bulunmaktadır (Nouraddini, Esmaiili, & Mohtarami, 2018)**,** (Soo & Sarbon, 2018)**,** (Arquelau & Silva, 2019)**,** (Chaturvedi, 2019)**,** (Grossoa, 2020)**,** (Díaz & Ferreiro, 2019). Un esaslı filmlerin genel özelliği nişasta, protein, lipit ve lif bileşenlerin arasında gerçekleşen çeşitli doğal ve içsel molekül etkileşimlerinin bulunmasıdır. Ayrıca içeriğinde diyet lifleri, antioksidanlar ve vitaminler gibi biyoaktif bileşiklerden oluşmaktadır. Bu bileşiklerle üretilen yenilebilir filmlerin fonksiyonel ve besinsel özellikleri büyük önem taşımaktadır (Drakos, Pelava, & Evageliou, 2018). Yenilebilir filmlerde mekanik özelliklerini geliştirmek amacıyla düşük molekül ağırlığına sahip plastikleştiriciler ilave edilir. Ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan ajanlar gibi maddeler de gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla yenilebilir filmlere eklenir.

Bu çalışmada kompozit materyal olarak, %75 karbonhidrat, %11 protein, %12 diyet lifi ve yağ içeren, çavdar unu kullanılmıştır. Plastikleştirici olarak sorbitol kullanılırken, antimikrobiyal ajan olarak da tannik, tartarik, suksinik ve gallik asit gibi meyve asitleri ilave edilerek yenilebilir film üretilmiştir. Plastikleştirici derişiminin film kalitesine etkisi ve meyve asitleriyle oluşturulan filmlerin antimikrobiyal etkilerinin gözlemlenmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Çavdar Unundan Yenilebilir Filmin Hazırlanması

Çavdar unundan yenilebilir film hazırlanmasında çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Çavdar unu 112 µm elekten geçirilerek altta kalan fraksyon kullanılmıştır. Çavdar unu (%5 w/v) ve farklı miktarda sorbitol (%30-100 (w/w un)), saf su içerisinde homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Çözelti 90 ºC'de yarım saat çalkalamalı su banyosunda pişirildikten sonra çözeltide hava kabarcığı kalmaması için 5 dk ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Çözelti 90mmx8mm steril plastik petri kaplarına 20 g dökülerek 40 ºC 24 saat etüvde kurutulmuştur.

## Çavdar Ununa Meyve Asitlerin İlavesiyle Yenilebilir Filmin Hazırlanması

Çavdar unu (%5 w/v) ve sorbitol (%30-100 (w/w un)), saf su içerisinde homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Çözelti 90 ºC 'lik çalkalamalı su banyosunda yarım saat pişirildikten sonra 40 ºC ye soğutulmuştur. Soğutulan çözeltinin içerisine meyve asitleri (tannik, tartarik, suksinik ve gallik asit ( %5 (w/w un)) eklenmiştir. Asitlerin ilavesiyle çözelti homojen olana kadar karıştırılmış ve solüsyonda hava kabarcığı kalmaması için 5 dk ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Çözelti 90mmx8mm steril plastik petri kaplarına 20 g dökülerek 40 ºC 24 saat etüvde kurutulmuştur.

## Yenilebilir Filmlerin Karakterizasyonu

### Kalınlık

Filmlerin kalınlık ölçümünde ASİMETO 307-06-A model 0,001 mm hassasiyetli dijital mikrometre cihazından yararlanılmıştır. Ölçümler, 6 farklı bölgeden yapılmış ve ortalama değer opaklık ve su buhar geçirgenliği hesaplamalarında da kullanılmıştır (McHught & Krochta, 1994).

### Opaklık

Filmlerin opaklığı ,UV-1800 SHIMADZU marka cihaz kullanılarak 600 nm de absorbans değeri ölçülmüş ve bu değerin filmlerin kalınlığa bölünmesiyle opaklık değeri bulunmuştur (Nouraddini, Esmaiili, & Mohtarami, 2018)(Eşitlik 1).

$$Opaklık = \frac{T}{x} \quad (1)$$

T :600 nm de absorbans değeri

x :Film kalınlığı (m)

### Su Buhar Geçirgenliği

Deney kapları olarak deney cam tüpleri kullanılmıştır. Deney kaplarına 30 ml saf su konulmuş ve filmler 1.767 $cm^2$ 'lik yüzey alanına sahip I-CHEM kapaklara yerleştirilmiştir (Şekil 1). Hazırlanan deney kapları gliserol çözeltisi (25 ºC, % 50 bağıl nem) ile birlikte ortam sıcaklığının 22 ºC olduğu desikatöre konulmuştur. Deney kaplarının ağırlığındaki değişim zamana karşı ölçülmüştür. Tartımlar ± 0.0001 g duyarlılığa sahip hassas terazi kullanılarak yapılmıştır. Ağırlık, zaman, filmlerin kalınlığı ve basınç farkı kullanılarak su buhar geçirgenliği (SBG) hesaplanmıştır (Kocakulak, Sumnu, & Sahin, 2019) (Eşitlik 2).

$$SBG = \frac{\Delta m * x}{A * \Delta t * \Delta P} \quad (2)$$

x :Film kalınlığı (m)

A :Yüzey alanı ($m^2$)

Δm :Değişen ağırlık (ng)

ΔP :Gazların kısmi basınç farkı (Pa)

Δt :Zaman (s)



**Şekil 1.** Su buhar geçirgenlik analizi için hazırlanan deney düzeneği

**Çözünürlük**

Filmlerin su içerisindeki çözünürlüğü için film örnekleri 1x1 cm şeklinde kesilmiş ve ağırlıkları ± 0.0001 g duyarlılığa sahip hassas terazi kullanılarak başlangıç ağırlıkları not edilmiştir. Film örnekleri 40 ml saf suda oda sıcaklığında 24 saat boyunca sabit karıştırma hızı ile karıştırıcıda çözündürülmüştür. Çözelti filtre kağıdı ile süzdürülmüş ve örnekler 70 °C'de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Film örneğinin % çözünürlüğü (Eşitlik 3) ile hesaplanmıştır (Colla & Menegall, 2006).

$$\%\ \text{Çözünürlük} = \frac{(w_0 - w_t)}{w_0} * 100 \qquad (3)$$

$w_0$ :Başlangıç örnek ağırlıkları (g)

$w_t$ :Son kuru ağırlık (g)

**Yenilebilir Filmlerin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Filmlerin yüzde uzama ve çekme mukavemetinin belirlenmesinde INSTRON 5944MTS modeli mekanik test cihazının ISO 527-2-5a standardı esas alınarak kopma anındaki mukavemet değerlerinin ve uzama değeri belirlenmiştir. ISO 527-2-5a standardına uygun olarak kesilen film örnekleri, cihazın iki çenesi arasına yerleştirilmiş ve 5 mm/dk çekme hızı ile çekilmiştir. Kopma anındaki mukavemet değerlerinin ve uzama değeri test cihazına bağlı bilgisayar programı yardımıyla hesaplanmıştır.

**Yenilebilir Filmlerin Termal Gravimetrik Analiiz (TGA)**

Filmlerin TGA eğrileri, PERKIN ELMER STA 6000 marka cihaz kullanılarak elde edilmiştir. 40-600 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dk ısıtma hızı ile filmlerin kütlesindeki değişimi ölçülmüştür (Rios & Flores, 2017).

**Yenilebilir Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi**

Meyve asitleri ile hazırlanan yenilebilir filmlerin gram (-) *Salmonella typhimurium*, bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi için "Disk Diffüzyon" yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak kültürden öze yardımı ile alınan mikroorganizmalar sıvı besi ortamına aşılanmıştır. 35 °C'de 12 saat inkübasyonda bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kültür yoğunluğunun McFarland 0,5 bulanıklık standart değerine ulaşması için aşılanan sıvı besiyer ile kültürün absorbansı 400 nm de 0,4 e ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanmış kültürden agar katı besi yüzeyine 100 mikrolitre ekim yapılmıştır. Son olarak filmlerden kesilen 1 cm çaplı diskler ekim yapılan petrilere yerleştirilerek 35±2 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

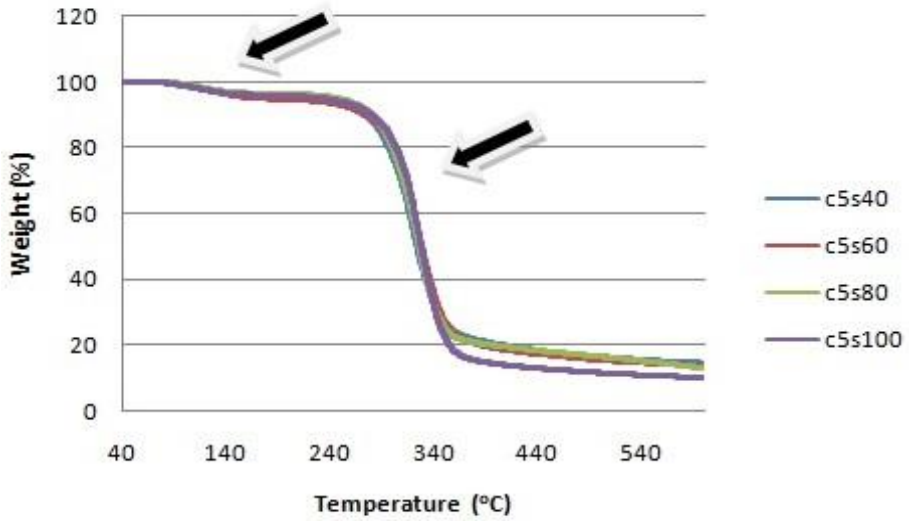
**BULGULAR ve TARTIŞMA**

Çavdar unu ve sorbitol kullanılarak üretilen bütün filmler steril plastik petri kaplarından kolayca soyulmuştur. Çavdar ununun farklı miktarda sorbitol (%30-100 (w/w un)) ilave edilerek elde edilen filmlerin kalınlık, opaklık, su buhar geçirgenliği (SBG), çözünürlük, çekme dayanımı ve uzama miktarı değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Buna göre kalınlık değerleri 0,156-0,202 mm arasında değişkenlik gösterip, artan sorbitol konsantrasyonu ile kalınlığın arttığı gözükmektedir. Filmlerin kalınlıkları arttıkça genel olarak opaklık değerleri de atmıştır. Literatürde 100,91 µm boyutlarında %5 (w/v) çavdar unu ve (0,5, 0,7 ve 1 g / g un) gliserol eklenerek yapılan filmlerin kalınlığı 0,69-0,73 mm arasında ve çözünürlüğü de % 51-58,38 arasında çıktığı gözükmektedir (Drakos, Pelava, & Evageliou, 2018). Sorbitol ve gliserol düz zincirli moleküllerdir. Ancak sorbitol glikoz moleküler yapısına daha çok benzerlik gösterdiğinden dolayı, polimerik zincirleriyle etkileşime girmesi yüksektir (Dias & Laurindo, 2010).Bu nedenden dolayı sorbitollu filmlerin suda çözünürlüğü yüksek çıkmıştır. Su buhar geçirgenliği %100 sorbitollu filmde en yüksek 0,754, %60 sorbitollu filmde en düşük 0,549 olduğu tespit edilmiştir. %60-100 sorbitollu filmlerde konsantrasyon arttıkça su buhar geçirgenliğinde de artış gözlemlenmiştir. Su buhar geçirgenliğini etkileyen en büyük faktör hidrofilik ve moleküller arası kuvvettir. Hidrofilik özelliğe sahip plastikleştirici ihtiva eden nişastadan oluşan filmlerde artan plastikleştirici konsantrasyonu ile su buhar geçirgenliğindeki artış yaygındır (Farhan & Han, 2017).

**Tablo 1.** Farklı konsantrasyonlu (%30-100 (w/w un) sorbitollu filmlerin mekanik özelliği, su buhar geçirgenliği (SBG) ve çözünürlüğü

| Film | Kalınlık (mm) | Opaklık | SBG (ng $m^{-1}$ $s^{-1}$ $Pa^{-1}$) | Çözünürlük (%) | Çekme Dayanımı (TS, MPa) | Uzama (%E) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ç5S%30 | 0,156±0,035 | 2,49±0,157 | 0,627±0,04 | 69,039±0,78 | 2,322±1,51 | 4,63±2,23 |
| Ç5S%40 | 0,163±0,016 | 2,73±0,369 | 0,605±0,04 | 65,36±6,147 | 4,887±0,68 | 10,92±7,49 |
| Ç5S%50 | 0,163±0,026 | 2,76±0,437 | 0,687±0,037 | 62,05±2,41 | 3,8±0,55 | 21,89±5,30 |
| Ç5S%60 | 0,176±0,018 | 2,88±0,365 | 0,549±0,031 | 66,905±1,53 | 2,635±0,24 | 23,36±4,68 |
| Ç5S%70 | 0,176±0,013 | 3,438±0,349 | 0,578±0,05 | 73,81±1,736 | 2,2±0,54 | 34,12±8,22 |
| Ç5S%80 | 0,182±0,019 | 3,667±0,53 | 0,681±0,056 | 74,39±4,575 | 1,09±0,24 | 40,29±6,53 |
| Ç5S%90 | 0,185±0,018 | 2,77±0,314 | 0,727±0,08 | 75,56±2,86 | 1,09±0,14 | 40,45±6,69 |
| Ç5S%100 | 0,202±0,018 | 2,767±0,358 | 0,754±0,19 | 83,62±6,95 | 0,72±0,13 | 46,74±6,29 |

Çekme dayanımı 0,72-4,887 MPa arasında çıkmıştır. Düşük kalınlık değerlerine sahip filmlerin uzama değerleri de düşüktür. Plastikleştirici konsantrasyonun artmasıyla filmlerin uzama kapasitesi de artmıştır ve gerilme mukavemetleri de azalmıştır. Unda bulunan lipit ve mikro yapı düzeyindeki düzensizlik gerilme ve uzama değerlerini etkilemiştir (Dias & Laurindo, 2010).Farklı konsanstasyona sahip sorbitollu filmlerin termogravimetrik analiz (TGA) termogramları Şekil 2.'de görülmektedir. Buna göre 2 ayrı bozunma basamağı gözlemlenmiştir. İlk bozunma basamağı 75-175 ºC aralığında olup yaklaşık %4 kütle kaybı gözükmektedir. Bu kaybın nedeni çözücü olarak kullanılan suyun buharlaşmasıyla gerçekleşmektedir. İkinci bozunma basamağı yaklaşık 220-375 ºC sıcaklık aralığında film yapısının bozulmaya başlamıştır. Film yapısının bozulmasıyla yaklaşık %76 kütle kaybı gerçekleşmiştir (Bahtimur & Tanyolaç, 2018).



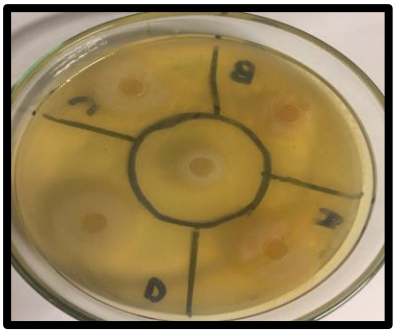

**Şekil 2.** Farklı konsantrasyonlu (%30-100 (w/w un) sorbitollu filmlerin termogravimetrik analizi

Tablo 2'de %40 (w/w un) konsantrasyonuna sahip sorbitolun, %5 (w/w un) asitli filmlerin ve kalınlık, opaklık, su buhar geçirgenliği (SBG), çözünürlük, çekme dayanımı ve uzama miktarları gösterilmiştir.

**Tablo 2.** %40 (w/w un) sorbitolun, %5 (w/w un) asitli filmlerin mekanik özelliği, su buhar geçirgenliği (SBG) ve çözünürlüğü

| Film | Kalınlık (mm) | Opaklık | SBG ($ngm^{-1}s^{-1}Pa^{-1}$) | Çözünürlük (%) | Çekme Dayanımı (TS, MPa) | Uzama (%E) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ç5S%40 | 0,163±0,017 | 2,73±0,369 | 0,60±0,036 | 65,36±6,15 | 4,88±0,68 | 10,92±7,49 |
| Ç5S%40-TAN%5 | 0,156±0,025 | 4,49±0,285 | 0,59±0,105 | 61,59±0,56 | 4,78±0,59 | 3,57±0,76 |
| Ç5S%40-GAL%5 | 0,151±0,02 | 3,49±0,373 | 0,68±0,045 | 64,76±2,34 | 3,37±0,52 | 13,82±3,05 |
| Ç5S%40-TAR%5 | 0,166±0,036 | 2,298±0,36 | 0,65±0,137 | 64,84±3,15 | 5,04±0,27 | 9,27±1,33 |
| Ç5S%40-SUC%5 | 0,132±0,023 | 3,288±0,75 | 0,71±0,08 | 74,05±5,86 | 2,81±0,53 | 23,6±2,68 |

Meyve asitleriyle üretilen yenilebilir filmlerde kalınlık değerleri orijinal filme yakın çıkmıştır ancak suksinik asit ilave edilmiş filmde kalınlık düşmüştür. Bunun nedeni suksinik asitin çapraz bağlanma yoluyla su iletim kapasitesini azaltan ester bağlarındaki hidrofobik yapılardan kaynaklanıyor olabilir (Thessrimuang & Prachayawarakorn, 2019).




**Şekil 3.** Disk difüzyon metoduyla *Salmonella typhimurium'*a karşı antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi ( A: Gallik asit %5, B: Tannik asit %5, C: Tartarik Asit %5, D: Suksinik Asit %5, Orta: Kontrol-asit içermeyen film)

%5 (w/w un) asit içeren filmlerin *S. typhimurium* gram-negatif bakterisine karşı-antimikrobiyal aktivite etkisi olduğu Şekil 3'de gözükmektedir. Disk difüzyon sonuçlarına göre; bütün meyve asitlerinin antimikrobiyal etkisi olduğu, tartarik ve suksinik asitin diğer asitlere göre daha etkili olduğu bulunmuştur.

## SONUÇ

Bu çalışmada çavdar unu ile hazırlanan yenilebilir filmlerin, un bazlı filmlerinkine benzer mekanik özellikler taşıdığı görülmüştür. Sorbitolun filme katkısı ise filmin homojen bir yüzeye sahip olmasını ve daha dayanıklı, elastik film oluşmasını sağlamıştır. Su buhar geçirgenliği, kalınlık, çözünürlük, opaklık ve mekanik özellikler sorbitol konsantrasyonundan ve meyve asitlerden etkilenmiştir. Genel olarak meyve asitlerinin antimikrobiyal etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

## KAYNAKLAR

Arquelau, P. B., & Silva, V. D. (2019). Characterization of edible coatings based on ripe "Prata" banana peel flouR. Food HydrocolloidS , 89: 570-578.

Bahtimur, E. D., & Tanyolaç, D. (2018). Production and characterization of antimicrobial edible film from lemon peel. http://hdl.handle.net/11655/5533. adresinden alınmıştır

Candan, T., & Bağdatlı, A. (2018). Gıda Ürünlerinde Yenilebilir Film ve Kaplama Uygulamaları. El-Cezerî Journal of Science and Engineering , 5(2): 645-655.

Chaturvedi, K. (2019). Composite edible coatings from commercial pectin, corn flour and beetroot powder minimize post-harvest decay, reduces ripening and improves sensory liking of tomatoes. International Journal of Biological Macromolecules , 133:284-293.

Colla, E., & Menegall, F. C. (2006). Amaranthus cruentus Flour Edible Films: Influence of Stearic Acid Addition, Plasticizer Concentration, and Emulsion Stirring Speed on Water Vapor Permeability and Mechanical Properties. Journal of Agrıcultural and Food Chemıstry , 54:6645-6653.

Dias, A. B., & Laurindo, J. B. (2010). Biodegradable films based on rice starch and rice flour. Journal of Cereal Science , 51:213-216.

Díaz, O., & Ferreiro, T. (2019). haracterization of Chickpea (Cicer arietinum L.) Flour Films: Effects of pH and Plasticizer Concentration. International Journal of Molecular Sciences , 20(5): 1246.

Drakos, A., Pelava, E., & Evageliou, V. (2018). Properties of flour films as affected by the flour's source and particle size. Food Research International , 107: 551-558.

Farhan, A., & Han, N. M. (2017). Characterization of edible packaging films based on semi-refined kappa-carrageenan plasticized with glycerol and sorbitol. Food Hydrocolloids , 64:48-58.

Grossoa, A. L. (2020). Increase of walnuts' shelf life using a walnut flour protein-based edible coating. LWT-Food Science and Technology .

Kocakulak, S., Sumnu, G., & Sahin, S. (2019). Chickpea flour-based biofilms containing gallic acid to be used as active edible films. Journal of Applied Polymer Science , vol.136.

McHught, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Sorbitol- vs Glycerol-Plasticized Whey Protein Edible Films: Integrated Oxygen Permeability and Tensile Property Evaluation. Iournal of Agricultural and Food Chemistrv , 42(4).

Nouraddini, M., Esmaiili, M., & Mohtarami, F. (2018). Development and characterization of edible films based on eggplant flour and corn starch. International Journal of Biological Macromolecules , 120: 1639-1645.

Rios, & Flores, S. H. (2017). Comparative study on the properties of films based on red rice (Oryza glaberrima) flour and starch. Food Hydrocolloids , 65:96-106.

Soo, P. Y., & Sarbon, N. M. (2018). Preparation and characterization of edible chicken skin gelatin film incorporated with rice flour. Food Packaging and Shelf Life , 15: 1-8.

Thessrimuang, N., & Prachayawarakorn, J. (2019). Characterization and Properties of High Amylose Mung Bean Starch Biodegradable Films Cross-linked with Malic Acid or Succinic Acid. Journal of Polymers and the Environment , 27:234–244.

Yıldız, P. O., & Yangilar, F. (2016). Yenilebilir Film ve Kaplamaların Gıda Endüstrisinde Kullanımı. BEU Journal of Science , 5(1): 27-35.

# Türkiye'deki bir devlet üniversitesi yerleşkesindeki kişilerin tavuk eti üretimi ve tüketimine bakış açıları

Canan KOP BOZBAY

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, 26480, Eskişehir, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: cbozbay@ogu.edu.tr

**Özet**

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yerleşkesindeki kişilerin tavuk eti üretimi ve tüketimine ilişkin bakış açılarını değerlendirmek için yapılmıştır. Bu amaçla, örnek hacmi, ana kitle oranlarına dayalı kümelendirilmemiş tek aşamalı basit tesadüfî olasılık örnekleme yöntemi ile belirlenen, 257 Doktoralı öğretim üyesi (akademisyen), 378 lisans öğrencisi (öğrenci) ve 166 en az ortaokul mezunu sürekli işçi (işçi) ile yüz yüze anket yapılmıştır. Akademisyenlerin tavuk eti tercih etme oranları (%16.8), öğrenci (%52.6) ve işçilerden (%30.6) daha düşük bulunmuştur. Konvansiyonel tavuk etini tercih eden akademisyenlerin oranı (%68.2) öğrenci (%25.4) ve işçilerin (%6.4) oranından daha yüksek bulunmuştur. Katılımcıların %70.5'i yazılı ve görsel basından tavuk eti güvenilirliği hakkında yanlış bilgi edinirken bu haberler tüketimi olumsuz etkilemiştir. Çalışmanın bulguları eğitim düzeyi arttıkça kişilerin tavuk eti üretimi ile ilgili asparagas medya haberleri nedeniyle tavuk eti tüketiminin azaldığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Anket, tavuk eti, tüketim, eğitim, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

## Perspectives on chicken meat production and consumption of the people in a state university campus in Turkey

**Abstract**

This study was carried out to evaluate the perspectives on chicken meat production and consumption of people at Eskişehir Osmangazi University Campus. For this purpose, face-to-face survey with 257 Ph.D. faculty members (academicians), 378 undergraduate students (students) and 166 at least secondary school graduates (worker), determined by the sample volume, non-clustered single-stage simple random probability sampling method based on main population rates it is made. The rates of academics preferring chicken meat (16.8%) were lower than students (52.6%) and workers (30.6%). The proportion of academicians who preferred conventional chicken meat (68.2%) was higher than students (25.4%) and workers (6.4%). While 70.5% of the participants obtained wrong information about the reliability of chicken meat from written and visual media, these news affected consumption negatively. The findings of the study show that as the level of education increases, the consumption of chicken meat decreases due to false media reports about chicken meat production.

**Keywords:** Survey, chicken meat, consumption, education, Eskişehir Osmangazi University

## GİRİŞ

Tavuk eti, içerdiği besin maddeleri (özellikle protein ve doymamış yağ asitleri) ve nispeten ucuz olması bakımından insan beslenmesi için önemli bir gıda kaynağıdır (Gao ve Charter, 2000; Shruti ve ark., 2019). Eğitimli bir tüketici, hayvansal gıdaların niteliği ve niceliği ile ilgili olarak sorumlu kararlar alabilmektedir (Petroman ve ark., 2015). Ancak, bilimsel verilere dayanmamasına rağmen, medya haberleri eğitimli de olsa insanların tavuk eti tüketimi her geçen gün olumsuz etkilemektedir (Eleroğlu ve ark., 2018). Gerçekten de, özellikle eğitimli ve gelir durumu yüksek olan tüketiciler, tavuk etini insan sağlığı açısından riskli bulduklarını ve bu nedenle de ya hiç tüketmedikleri ya da oldukça azalttıklarını bildirmişlerdir (Ayvazoğlu Demir ve Aydın, 2018).

Türkiye'de etlik piliç yetiştiriciliğinin geliştirilmesi açısından eğitim kurumlarında öğrenciler ile tavuk eti tüketim alışkanlıklarının incelendiği çalışma sayısı sınırlı iken (Cevger ve ark., 2008; İskender ve ark., 2015) kurumdaki tüm kişileri kapsayan çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yerleşkesinde eğitim düzeyinin kişilerin tavuk eti üretimi ve tüketimine ilişkin bakış açıları üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yerleşkesinde bulunan üç farklı meslek grubuna sahip tüketiciler ile yüz yüze görüşme yöntemiyle yapılan anketlerden sağlanan veriler oluşturmuştur. Araştırmaya dâhil edilecek katılımcıların belirlenmesinde örneklem alma yoluna gidilmiştir. Bu amaçla tabakalı örnekleme yöntemi kullanılmış olup Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'ni temsil etmesi açısından fakülteler tabaka olarak ele alınmıştır. Üç farklı meslek grubu belirlenerek, 257 Doktor unvanına sahip öğretim üyesi (akademisyen), 378 lisans öğrencisi (öğrenci) ve 166 sürekli işçi ile anket yapılmıştır. Çalışmanın verileri SPSS 17.0 ortamında sayı, yüzde, ortalama ve korelasyon analizi kullanılarak analiz edilmiştir.

Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (03.04.2018/16) onaylanmıştır.

## BULGULAR

Tavuk eti üretimi ve tüketimine ilişkin bakış açılarının tüketicilerin eğitim ve meslek grubuna göre değişebileceği düşüncesinden hareketle araştırma üç meslek grubuna ayrılarak değerlendirilmiştir. Araştırma kapsamında anket çalışmasına katılanların %32.5'i akademisyen, %46.5'i öğrenci ve %21'i sürekli işçidir.

İncelenen meslek gruplarının tavuk eti tüketim yapısı, tavuk eti ürün bilgisi ve tavuk eti tüketim trendleri Tablo 1'de sunulmuştur. Akademisyen, öğrenci ve sürekli işçilerin haftalık et alımında kırmızı eti tercih etme oranları sırasıyla %65.2, %29.6 ve %5.1 iken tavuk eti tercih etme oranları %16.8, %52.6 ve %30.6'dır. Ayrıca akademisyen ve öğrencilerin balık tükettiği gözlemlenmişken ankete katılan sürekli işçilerden hiçbirinin balık tüketmediği dikkat çekmektedir. Meslek gruplarına göre haftada en az (bir) ve en çok (beş ve üzeri) et tüketenlerin öğrenciler olduğu görülmektedir. Meslek grupları içerisinde tavuk eti satın alınırken öğrencilerin %69.5'i, akademisyen ve sürekli işçilerin ise sırasıyla %28.3 ve %2.2 oranında organik tavuk etini tercih edeceğini belirtirken aynı şeklide köy tavuğunu öğrenciler %42.6 ile en fazla tercih eden grup olmuştur. Konvensiyonel tavuk etinde ise en yüksek oran (%68.2) akademisyenlerde belirlenmiştir. Katılımcıların %52.8'i işlenmiş tavuk eti tükettiğini belirtmiştir. Meslek grupları içerisinde %60.2 ile en yüksek oranda işlenmiş tavuk eti tüketenler öğrenciler iken, en düşük grubu sürekli işçiler oluşturmuştur.

Katılımcıların %78'i tavuk eti tüketiminin beslenme açısından önemli olduğunu düşünmektedir. Çok ilginçtir ki, akademisyenlerin %64.9'u tavuk etinin beslenme açısından önemli olmadığını belirtmiştir. Katılımcıların %56.7'si etçi ve yumurtacı tavukların aynı genotipe sahip olmadığını belirtirken, aynı genotipe sahip olduğunu düşünenlerin içinde akademisyenlerin oranı %64.8, öğrencilerin oranı %29.6 ve sürekli işçilerin oranı ise %5.6'dır.

Tavuk eti güvenilirliği hakkında akademisyen ve öğrenciler, işçilere kıyasla daha fazla bilgiye sahip oldukları belirlenmiştir. Akademisyenlerin %65.8'i bu konuda uzmanlardan bilgi alırken, öğrenci (%31.6) ve işçiler (%2.6) arasında bilgi edinmeye ihtiyaç duyanların oranı daha düşüktür. Medya araçlarından faydalanma akademisyen ve öğrencilerde birbirine yakın iken sürekli işçiler daha az faydalanmaktadır. Haberler sonrası meslek grupları içerisinde tavuk eti tüketimini azaltanların %46.3'ü akademisyen ve %53.7'si öğrenci iken sürekli işçilerde %0'dır. Ayrıca bu haberler sonrası artık tavuk eti tüketmiyorum diyenlerin %93.7'sini akademisyenler oluştururken bu oran öğrencilerde %6.3 ve sürekli işçilerde yine %0'dır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüketicilerin tavuk eti seçimi, genellikle, kültür, din, yaşam tarzı, bilgi, sağlık kaygıları, gelir düzeyi ve medyadan etkilenen gıda eğilimleri dahil birçok faktör tarafından yönetilmektedir (Popa ve ark., 2011). Yapılan çalışmada, haftalık et alımında kırmızı et tercih edenlerin çoğunu akademisyenler oluştururken, tavuk eti tercih edenlerin çoğunluğunu öğrenciler oluşturmaktadır. Sürekli işçi grubunda ise kırmızı et tercihi ve ayrıca haftalık et tüketim miktarları diğer gruplardan daha düşük tespit edilmiştir. Bu durum gelir seviyesi arttıkça kişilerin kırmızı et tüketimlerinin artmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca haftalık tavuk eti tüketim sıklığının öğrencilerde akademisyenlerden fazla olması da bu düşünceyi desteklemektedir. Öğrencilerin günlük yaşamda hızlı bir tempoya sahip oldukları ve zamandan tasarruf etmek için istekli olmaları göz önüne alındığında hayvansal protein kaynağı olarak hazırlaması daha pratik olan tavuk etini tercih ettikleri anlaşılmaktadır (Sucan, 2012; Marin ve ark. 2013). Nitekim işlenmiş tavuk eti tüketenlerin içerisinde öğrencilerin en yüksek orana (% 60.2) sahip olmaları bu tercihin nedenini açıklamaktadır.

**Tablo 1.** Katılımcıların tavuk eti tüketim yapısı, ürün bilgisi ve tüketim trendleri

| Sorular ve Cevap Seçenekleri | Akademisyen n (%) | Öğrenci n (%) | Sürekli işçi n (%) | Toplam n | Ki-kare ve P değeri |
|---|---|---|---|---|---|
| Haftalık et alımında en çok hangisini tercih edersiniz? | | | | | |
| Kırmızı et | 165 (65.2) | 75 (29.6) | 13 (5.1) | 253 | |
| Tavuk eti | 84 (16.8) | 263 (52.6) | 153 (30.6) | 500 | 210.04 |
| Balık | 8 (21.6) | 29 (78.4) | 0 (0) | 37 | P<0.001 |
| Toplam | 257 (32.5) | 367 (46.5) | 166 (21) | 790 | |
| Haftalık tavuk eti tüketim sıklığınız nedir? | | | | | |
| 1 | 163 (63.2) | 67 (26) | 28 (10.9) | 258 | |
| 2 | 72 (26) | 95 (34.3) | 110 (39.7) | 277 | |
| 3 | 17 (9.7) | 130 (74.3) | 28 (16) | 175 | 309.59 |
| 4 | 1 (2) | 50 (98) | 0 (0) | 51 | P<0.001 |
| >5 | 0 (0) | 23 (100) | 0 (0) | 23 | |
| Toplam | 253 (32.3) | 365 (46.6) | 166 (21.2) | 784 | |
| Tavuk eti satın alırken tercihiniz hangisi olurdu? | | | | | |
| Organik | 63 (28.3) | 155 (69.5) | 5 (2.2) | 223 | |
| Konvansiyonel | 118 (68.2) | 44 (25.4) | 11 (6.4) | 173 | 243.01 |
| Köy tavuğu | 76 (19.3) | 168 (42.6) | 150 (38.1) | 394 | P<0.001 |
| Toplam | 257 (32.5) | 367 (46.5) | 166 (21) | 790 | |
| İşlenmiş tavuk eti tüketiyor musunuz? | | | | | |
| Hayır | 128 (34.3) | 116 (31.1) | 129 (34.6) | 373 | 98.51 |
| Evet | 129 (30.9) | 251 (60.2) | 37 (8.9) | 417 | P<0.001 |
| Toplam | 257 (32.5) | 367 (46.5) | 166 (21) | 790 | |
| Tavuk eti tüketimi beslenmemiz açısından önemli midir? | | | | | |
| Hayır | 113 (64.9) | 55 (31.6) | 6 (3.4) | 174 | 115.407 |
| Evet | 144 (23.4) | 312 (50.6) | 160 (26) | 616 | P<0.001 |
| Toplam | 257 (32.5) | 367 (46.5) | 166 (21) | 790 | |
| Sizce etçi ve yumurtacı tavuklar aynı genotipe mi sahiptir? | | | | | |
| Bilmiyorum | 45 (19.2) | 186 (79.5) | 3 (1.3) | 234 | |
| Hayır | 142 (31.7) | 149 (33.3) | 157 (35) | 448 | 223.368 |
| Evet | 70 (64.8) | 32 (29.6) | 6 (5.6) | 108 | P<0.001 |
| Toplam | 257 (32.5) | 367 (46.5) | 166 (21) | 790 | |
| Son altı ayda tavuk etinin güvenilirliği ile ilgili hangi kaynaklardan bilgi aldınız? | | | | | |
| Gazete ve dergi | 55 (60.4) | 36 (39.6) | 0 (0) | 91 | |
| Radyo ve televizyon | 104 (49.3) | 93 (44.1) | 14 (6.6) | 211 | |
| Ürün etiketlerini okuyorum | 37 (46.8) | 41 (51.9) | 1 (1.3) | 79 | 338.448 |
| Uzmanlara soruyorum | 25 (65.8) | 12 (31.6) | 1 (2.6) | 38 | P<0.001 |
| Yakın çevre | 31 (29.2) | 65 (61.3) | 10 (9.4) | 106 | |
| Almadım | 5 (1.9) | 120 (45.3) | 140 (52.8) | 265 | |
| Toplam | 257 (32.5) | 367 (46.5) | 166 (21) | 790 | |
| Bu haberler tavuk eti tüketim miktarınızı ne yönde etkiledi? | | | | | |
| Arttı | 1 (4.8) | 20 (95.2) | 0 (0) | 21 | |
| Azaldı | 57 (46.3) | 66 (53.7) | 0 (0) | 123 | 203.908 |
| Değişmedi | 63 (18) | 182 (52) | 105 (30) | 350 | P<0.001 |
| Artık Tüketmiyorum | 59 (93.7) | 4 (6.3) | 0 (0) | 63 | |
| Toplam | 180 (32.3) | 272 (48.8) | 105 (18.9) | 557 | |

Modern endüstriyel tavuk eti üretim uygulamaları, kırmızı etin fiyatının yarısından daha az bir maliyetle et sağlamak için tasarlanmıştır. Yoğun tarım algısı konusunda olumsuz düşüncelere sahip olan tüketicilerin, hayvan refahı standartlarının dikkate alındığı ve takip edildiği sistemlerde üretilen gıdalar için daha fazla ödeme yapmaya istekli oldukları yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Köbrich ve ark., 2001; Maria, 2006;

Bonamigo ve ark., 2012). Öyle ki mevcut çalışmada tavuk eti satın alınırken organik ürünleri tercih edenlerin çoğunluğunu öğrenciler oluştururken, konvensiyonel ürünleri ise akademisyenlerin yüksek oranda tercih ettiği görülmüştür.

Günümüzde tüketiciler tarafından medya haberlerinin doğruluğundaki sorunlar nedeniyle hayvan refahı hakkında çok az şey bilinmektedir. Nitekim araştırmada katılımcıların tavuk eti ürün bilgisi yetersizliği, hayvansal gıdaların insan yaşamındaki öneminin yeterince özümsenmediğinin bir göstergesidir. İlginçtir ki yapılan çalışmada tavuk etinin beslenmemiz açısından önemli olmadığını belirtenlerin %64.9'unu akademisyenler oluştururken, %3.4'ünü sürekli işçiler oluşturmuştur. Nitekim öğrenci ve akademisyenlerin sürekli işçilerden daha fazla yanlış tavuk eti ürün bilgisine sahip olduğu aşikârdır. Aynı şekilde öğrenci ve akademisyenlerin sürekli işçilerden daha fazla medya haberlerine rastladıkları ve bu yanlış haberlerden daha çok etkilendikleri belirlenmiştir. Bu durum son zamanlarda medya da tavuk eti üzerine çıkan olumsuz ve gerçeği yansıtmayan eleştirilerin tüketicilerin tavuk eti tüketimini etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar medyanın yanlış yönlendirmesi ile kişilerin insan beslenmesinde gerek sağlık gerekse ekonomik yönden önemli bir yere sahip olan tavuk eti hakkında yanlış bilgiler edinmesine, böylece tüketimin azalmasına neden olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. En önemlisi medya haberlerinin etkisi ile Akpınar ve Yurdakul (2001)'un aksine, eğitim seviyesindeki yükselmeyle daha bilinçli bir tüketici kitlesine doğru gidişin olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi yerleşkesindeki kişilerin tavuk eti üretimi ile ilgili yanlış bilgilere sahip oldukları, bu yanlış bilgilerin asparagas haberler kanalıyla gerçekleştiği ve böylece tüketimin yanlış medya algısı ile azaldığı görülmektedir. Bu nedenle tüketiciler insan beslenmesinde sağlıklı ve besleyici bir gıda olan tavuk eti üretimi konusunda bilgilendirilmeli, tavuk eti tüketiminin medya baskısından etkilenmemesi için gerekli önemler alınmalı ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile sektör paydaşları ve konu uzmanları tarafından tavuk etlerinin yasal mevzuata uygun olarak üretildiği bilgileri düzenli olarak kamuoyu ile paylaşılmalıdır. Çünkü tavuk eti tüketimindeki artış tüketiciye verilen güvencenin artırılması ile mümkün olacaktır.

## TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Araş. Gör. Dr. Hasan Samet ABACI'ya teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Akpınar GM, Yurdakul O. 2001. 2000'li yıllarda Türkiye'de gıda tüketici profilindeki değişim. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 16:73-82.

Ayvazoğlu Demir P, Aydın E. 2018. Hormon ve antibiyotik kullanimina ilişkin olumsuz haberlerin tüketicilerin tavuk eti tüketim alişkanliklarina etkisi (Kars ili örneği). MAE Veteriner Fakültesi Dergisi, 3: 55-63.

Bonamigo A, Bonamigo CBSS, Molento CFM. 2012. Broiler meat characteristics relevant to the consumer: Focus on animal welfare. Revista Brasileira Zootecnia, 41:1044-1050.

Cevger Y, Aralı Y, Demir P, Sarıözkan S. 2008. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi intern öğrencilerinde hayvansal ürünlerin tüketim durumu ve tüketici tercihleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 55:189-194.

Eleroğlu H, Bircan H, Arslan H. 2018. Yozgat il merkezinde yumurta ve tavuk eti tüketimi üzerine etki eden faktörler. Türk Tarım Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6(6): 756-763.

Gao YC, Charter EA. 2000. Nutritionally important fatty acids in hen yolks from different sources. Poultry Science, 79:921-24.

İskender H, Kanbay Y, Özçelik E. 2015. Artvin Çoruh Üniversitesi öğrencilerinin tavuk eti tüketim tercihleri. F.Ü. Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 29:9-13.

Köbrich K, Maino M, Diaz C. 2001. El bienestar animal como atributo de diferenciación en la compra de alimentos de origen animal. Econ. Agraria, 6:251-260.

Maria GA. 2006. Public perception of farm animal welfare in Spain. Livestock Science, 6:103, 250-256.

Marin D, Petroman I, Popescu M, Petroman C, Iosim I, Ciolac R, Dumitrescu C, Lozici A. 2013. Factors that influence consumer of rural and farm tourism behaviour. Lucrari stiintifice Management Agricol, XV(4), Timisoara.

Petroman C, Bidireac IC, Petroman I, Sucan M, Marin D, Turc B, Merce I, Constantin EC. 2015. The impact of education on the behaviour of the consumer of animal origin food products. Procedia - Social and Behavioral Sciences, 190:429-433.

Popa A, Draghici M, Popa M. 2011. Consumer choice and food policy: A literature review. Journal Environmental Protection and Ecology, 12:708-717.

Shruti S, Hussain A, De S, Chowdhury S, Nagarajan L, Surve V, Kumar A, Menezes E. 2019. Role of poultry meat in human diet. Poultry Punch, April 9, 2019.

Sucan MF, Petroman C, Petroman I, Marin D, Souca L, Dumitrescu A, Statie C. 2012. Notes on the impact of education an vegetal food consumer behaviour in the Timis county 2012, Roamania. Lucrari stiintifice Management Agricol, XIV(2),Timisoara.

# 1.2. POSTER PRESENTATIONS

# The relationship between cocaine and amphetamine-regulated transcript (cart) gene polymorphism ın childhood obesity

Fatima Dedemoglu*[1], Ahmet Anık[2], Gönül Çatlı[3], Ece Böber[4], Ayhan Abaci[4], Sefa Kizildağ[5]

[1*]Dokuz Eylul University Health Sciences Institute, Department of Medical Biology and Genetics, Izmir, Turkey
[2]Adnan Menderes University, Faculty of Medicine, Department of Internal Medical Sciences, Department of Child Health and Diseases, Aydin, Turkey
[3]Izmir University Of Health Sciences Tepecik Training And Research Hospital, Department of Child Health and Diseases, Izmir, Turkey
[4]Dokuz Eylul University Faculty Of Medıcıne, Internal Medıcıne Department Of Pedıatrıcs, Pedıatrıc Endocrinology, Izmir, Turkey
[5]Dokuz Eylul University, Faculty Of Medıcıne Basıc Medıcal Scıences, Department Of Medıcal Bıology, Izmir, Turkey

* E-mail of the corresponding author: fatimadedemoglu@gmail.com

## Abstract

Obesity is an important health problem caused by excessive increase in fat tissue in the body. Although it is seen in all age groups, it increases in childhood. Childhood obesity is important in adult hypertension, diabetes, cardiovascular diseases and high cholesterol formation potential. Oxidative stress has been shown to increase in obese individuals in recent years. The CART gene is located on chromosome 5 and one of the polymorphisms identified in the coding region is the A1475G polymorphism.
The aim of this study was to determine the prevalence in the CART gene polymorphism of obese children in Turkey; it is to reveal the relationship between metabolic-anthropometric parameters.
This study was conducted in 134 obese and 143 healthy controls aged between 3 and 18 years. Genotypes of the patients were determined by Real-Time PCR method after DNA isolation. The association of A1475G polymorphisms with metabolic and anthropometric parameters were investigated.
Weight, BMI, waist circumference, fat mass and fat percentage values were significantly higher in the obese group than control subjects ($p<0.05$). As a result of metabolic measurements, triglyceride levels were higher and HDL levels were lower in the obese group compared to the control group ($p < 0.05$). FBC values were significantly lower in the patients with G allele in the patient group ($p < 0.05$).
Analysis of A1475G polymorphism in CART gene did not make a significant difference in the results we see in Turkey populations. More comprehensive and meaningful results can be obtained in wider population.

**Keywords:** CART, obesity, polymorphism, A1475G, childhood obesity.

## INTRODUCTION

Obesity; is a disease that results in excessive fat in the body due to lack of balance between energy taken and consumption (Bray 1985). Obesity; is a general public health problem and can begin at any age. It has a multifactorial basis consisting of genetic, environmental, metabolic, hormonal and psychosocial factors (Deckelbaum and Williams 2001).
Obesity increases between 5-6 years of age and during puberty (Rosenbaum and Leibel 1989). It is known that approximately 30% of obesity patients in adulthood originate from childhood (Lobstein, Baur, and Uauy 2004).
With the limited studies conducted in Turkey, 7.4% of those in higher socio-economic level adolescents in the 11-15 age range, 15.3% of those in the lower socio-economic levels were found to be obese (Salans, Knittle, and Hirsch 1968). In another study conducted on 1024 primary school children, the prevalence of obesity was found to be 1.7% in children of high-income families, 1.9% in children of middle-income families, and 0.5% of children of low-income families (Kanbur, Derman, and Kinik n.d.; Soylu et al. 2000) .

The human CART gene is located on 5q13-14 and consists of 3 exons and 2 introns (James Douglass and Daoud 1996; Kuhar et al. 2002). It consists of 116 amino acids; CART protein consists of 102 or 89 amino acids (Kuhar et al. 2002).
The CART peptide is distributed both in the periphery and in the central nervous system (CNS). It is thought to play a role in sensory processing processes due to its high density in the retina, olfactory bulb and posterior roots of the spinal cord (Kuhar et al. 2002; Thim et al. 1998). The CART peptide is also found in the intestines, the islets of Langerhans in the pancreas, the myenteric plexus of the small intestine, the adrenal medulla, and the sympathetic ganglion neurons (Koylu et al. 2006; Tebbe et al. 2004).
The relationship between CART peptide and nutrition is thought to result from the mechanisms of the action of CART on fat metabolism. CART 55-102 fragments were found to increase circulating free fatty acids when applied as intracerebroventricular (Wortley et al. 2004)
CART has been identified as one of the most abundant mRNAs in the hypothalamus (Gautvik et al. 1996). There is a lot of evidence that CART plays a role in the control of mammalian feeding behavior. It is extensively expressed in the arcuate and paraventricular nuclei, which are known to have a role in the appetite control of the hypothalamus (J. Douglass, McKinzie, and Couceyro 1995; Koylu et al. 1997).
In general, the CART protein may be considered to be involved in appetite suppression, and a difference in the CART signal may play a role in the etiology of obesity, making the CART gene an important candidate in obesity research (Echwald et al. 1999).
The aim of the study was to determine the prevalence of A1475G SNP in the obese and healthy subjects and to evaluate the possible relationship between SNP and metabolic and anthropometric parameters in childhood obesity.

## MATERIALS AND METHODS

The present study includeed a total of 270 cases aged between 3 and 18 years. The study groups comprised 139 (71 females, 68 males) overweight and obese children and 131 (58 females, 59 males) normal weight children, evaluated in in Dokuz Eylul University, Pediatric Endocrinology Department between 2012 and 2013. The control group included apparently healthy children, which were investigated for minor healty problems (constipation, lower urinary tract infection, viral respiratory tract infection, etc.), without any chronic disease that could influence the results.

### Physical Examination and Anthropometric Characteristic

A standardized physical exam was performed in all children. Anthropometric evaluation included: body weight (kg), height (cm), wist circumference, hip circumference. The formula: body weight (kg) divided by the square of the height (m) was used as to assess BMI. All measurements were done on the right side of the subject and were obtained in triplicate by a team of trained persons. Body weight was measured with a daily calibrated scale. To evalulate height height, a daily calibrated pedometer was used.
We considered obesity for children who had BMI >95 p according to 2000 Centers for Disease Control and Prevention. The metabolic laboratory tests evaluated in all cases were: TSH (thyroid stimulating hormone), cholesterol, triglycerides, LDL cholesterol (low densitiy lipoprotin), HDL cholesterol (highdensity lipoprotein), insulin, fasting blood glucose.

### Genotyping

Genomic DNA was isolated from EDTA-anticoagulated whole blood samples using DNA Isolation Kit For Mammalian Blood (Roche) according to the manufacturer's protocol and stored at -20 C. For Genotyping CART A1475G we used a RealTime PCR-Hybridisation probe. Genotyping of the A1475G variant was performed by the RealTime PCR- Hybridisation probe as previously described (Pont-Kingdon and Lyon 2005).

### Statistical Analysis

The frequencies of alleles and genotypes were determined by counting the genotypes. Distrubution of genotypes in both group was compared by chi-square of Fisher exact test. The studied variables were described as frequencies and percentages or as means and SD; inferential statistics was done using T test and Mann Whitney tests for qualitative variables. Statistiscal tests were performed using the SPSS 15.0 software. Odds ratios (OR) with 95% intervals (Cl) were calculated to estimate the association between genotypes and measurements. A p value <0.05 was considered to have a statistical significance.

## Tables and Figures

**Table 1**. Anthropometric Measurement Results of Patient and Control Groups

| | Patient | Control | P Value |
|---|---|---|---|
| BMI | 29.8 (±4.8) | 17.8 (±3.0) | 0.000 |
| Height | 154.4 (±15.8) | 132.4 (±22.6) | 0.000 |
| Weight | 73.2 (±22.8) | 33.7 (±14.2) | 0.000 |
| Fat Weight* | 27.1 (±10.7) | 7.9 (±5.2) | 0.000 |
| Fat Percentage* | 36.9 (±6.8) | 23.3 (±6.7) | 0.000 |
| Waist circumference | 98.6 (±14.3) | 64.3 (±11.1) | 0.000 |

* Mann-Whitney U test was used to calculate the differences since the groups did not fit the normal distribution ($p < 0.05$).

**Table 2**. Metabolic Measurement Results of Patient and Control Groups

| | Patient | Control | P Value |
|---|---|---|---|
| TSH* | 2.4 (±1.1) | 2.3 (±0.7) | 0.987 |
| FBG* | 81.2 (±13.7) | 84.0 (±4.6) | 0.496 |
| Insulin | 15.5 (±9.3) | 13.9 (±22.3) | 0.715 |
| Cholesterol | 168.1 (±37.9) | 176.8 (±24.6) | 0.134 |
| HDL | 45.3 (±14.2) | 56.71 (±17.4) | 0.000 |
| LDL | 104.6 (±28.6) | 103.9 (±23.4) | 0.894 |
| TG | 119.3 (±72.8) | 82.0 (±35.6) | 0.007 |

**Table 3**. CART A1475G Genotype Distribution

| Allel Distrubition | Patient | Control | P Value |
|---|---|---|---|
| A | 162 (%60.4) | 166 (%64.8) | 0.978 |
| G | 106(%39.6) | 90 (%35.2) | 0.156 |
| Total | 268 (%100) | 256 (%100) | |

**Table 4**. CART A1475G Allele Distribution

| Genotype | Patient | Control | P Value |
|---|---|---|---|
| AA | 70 (%52.2) | 78 (%60.9) | 0.156 |
| AG | 22 (%16.4) | 10 (%7.8) | 0.033 |
| GG | 42 (%31.3) | 40 (%31.3) | 0.987 |
| Total | 134 (%100) | 128 (%100) | |

**Table 5**. The Relationship Between CART A1475G Polymorphisms and Anthropometric-Metabolic Parameters of Obese and Control Groups

| | | AA | AG+GG | P Value |
|---|---|---|---|---|
| Age | Patient | 11.35 (±3.1) | 12.3 (±2.9) | 0.151 |
| | Control | 10.48 (±3.6) | 10.87 (±2.7) | 0.264 |
| HDL (mg/dl) | Patient | 48.2 (±18.2) | 42.0 (±7.3) | 0.598 |
| | Control | 58.17 (21.7) | 56.3 (±9.) | 0.179 |
| BMI (kg/m$^2$) | Patient | 29.6 (±4.6) | 30.2 (±5.0) | 0.545 |
| | Control | 17.5 (±3.1) | 18.3 (2.8) | 0.554 |
| TSH | Patient | 2.4 (±1.0) | 2.3 (±1.0) | 0.792 |
| | Control | 2.3 (±0.8) | 2.3 (±0.5) | |
| FBG | Patient | 85.1 (±10.9) | 77.04 (±15.7) | 0.011 |
| | Control | 84.3 (±4.9) | 82.0 | |
| Insülin (mg/dl) | Patient | 14.9 (±9.9) | 16.2 (±9.2) | 0.390 |
| | Control | 18.2 (±29.1) | 7.6 (±3.9) | 0.308 |
| Cholesterol | Patient | 165 (±39.2) | 169.2 (±38.1) | 0.370 |
| | Control | 174.3 (±17.7) | 186.5 (±30.1) | 0.258 |
| Triglyceride (mg/dl) | Patient | 104.1 (±45.5) | 130.2 (±88.7) | 0.522 |
| | Control | 77.0 (±35.7) | 88.2 (±38.9) | 0.258 |
| LDL (mg/dl) | Patient | 172 (±103.8) | 105.98 (±28.7) | 0.375 |
| | Control | 100.7(±19.1) | 112.9 (±28.1) | 0.293 |
| Weight | Patient | 71.8 (±22.9) | 75.9 (±22.7) | 0.555 |
| | Control | 34.4 (±14.6) | 33.1 (±13.5) | 0.287 |
| Height | Patient | 153.5 (±15.4) | 156.4 (±16.8) | 0.598 |
| | Control | 133.1 (±23.6) | 132.0 (±20.9) | 0.615 |
| Waist circumference (cm) | Patient | 96.9 (±13.4) | 100.7 (±15.3) | 0.425 |
| | Control | 63.4 (±12.1) | 65.7 (±8.8) | 0.530 |
| Fat Weight | Patient | 25.7 (±9.9) | 28.6 (±11.4 | 0.308 |
| | Control | 7.3 (±5.3) | 10.2 (±4.8) | 0.516 |
| Fat Percentage | Patient | 35.5 (±7.3) | 38.1 (±6.6) | 0.257 |
| | Control | 22.7 (±6.9) | 25.2 (±7.1) | 0.947 |

Statistically not significant (p> 0.05)

**RESULTS**

The patient group and control group ranged from 3 to 18, the mean age was 10 years. There was no significant difference in terms of gender distribution in the patient and control groups (p> 0.05).

Weight, BMI, waist circumference, fat mass and fat percentage values were higher in the patient group and it was found to be statistically significant, as shown in table 1. As a result of metabolic measurements, triglyceride levels were higher and HDL levels were lower in the patient group compared to the control group (p < 0.05). Although LDL, TSH, insulin and total cholesterol levels were higher in the patient group, this difference is not statistically significant (p> 0.05), as shown in table 2.

When the distribution of genotypes in CART A1475G polymorphism is examined; 52.5% of the patient group had AA, 16.5% had AG, and 31% had GG genotype. 60.3% of the control group had AA, 8.4% AG, 31.3% GG genotype. In the patient group, the frequency of AG genotype was significantly higher than the control group (p<0.05). When the allele distribution was examined, G allele carriage was found to be higher in the patient group, but this difference was not statistically significant (p> 0.05), as shown in table 3-4.

The genotypes for CART A1475G polymorphism were divided into two groups as AA (non-polymorphism) and AG + GG (polymorphism) and examined for their relationship with laboratory parameters. In conclusion, fasting blood glucose levels are significantly higher in patients with G allele. In terms of other parameters, no significant difference is found between genotypes in both patient and control groups (p> 0.05).The results are given in Table 5 (p> 0.05).

## DISCUSSION

We determine the prevalence of A1475G SNP in our own society for lack of similar studies carried out in Turkey.

A survey was conducted by the Ministry of Health of children and adolescents with obesity prevalence of 8.5% in 0-5 years old (male 10.1%, female 6.8%), in 6-18 years 8.2% (male 9.1%, female 7.3%), respectively. The increasing prevalence of obesity becoming a public health problem has led to the beginning of the fight against obesity all over the world (Obezite n.d.).

Studies have shown that CART mRNA is abundant mRNA in hypothalamus (Gautvik et al. 1996). CART is densely expressed in the arcuate and paraventricular nucleus of the hypothalamus, which is known as the appetite control area (J. Douglass, McKinzie, and Couceyro 1995; Koylu et al. 1997) . One patient was identified as heterozygous for the Ser66Thr missense mutation in exon 2 of the CART gene (Gen-Bank accession number U20325). Even though there isn't much information about CART, we know that the serine amino acid is preserved in humans and mice. This variant was found in a Caucasian, 95kg, 14-year-old patient who was diagnosed with severe obesity at the age of 4 years. Eleven family members (four obese and seven non-obese) were also analyzed and the Ser66Thr variant could not be associated with the obese phenotype (three of the four obese members and three of the seven non-obese members had this variant. In another study, Ser66Thr variant was found in an obese patient and the same mutation could not be found in any of the 100 subjects in the control group (Challis, Yeo, Farooqi, Luan, Aminian, Halsall, Keogh, Wareham, and Rahilly 2000).

In addition to this rare mutation, 2 SNPs (A1475G and DA1457) were detected in the 3 'UTR region of exon 3. The heterozygous variant (A1475G) on the 39th base after the stop codon in the 3 'UTR region of exon 3 was found in 18 patients (19.8%). The second variant is the deletion on the 21st base in the same region (DA1457). In one study, DA1457 variant was examined in 91 patients. 80 were homozygous AA (87.9%), 10 were heterozygous (11.0%), and 1 was homozygous deletion (1.1%). The same variations were examined in 757 obese and 8890 controls in the Danish population, but found no significant results (J. Douglass, McKinzie, and Couceyro 1995).

In another study conducted in Italy, 130 obese children and adolescents were examined; In 130 patients who underwent sequencing, these two mutations were prominent, with an allele frequency of 1457delA, 0.035 and the A1475G allele frequency of 0.042 (Miraglia Del Giudice et al. 2001). These variants in the 3 'UTR region may directly affect mRNA stability or may indirectly affect CART expression by causing linkage imbalance in the CART gene or nearby genes (Challis, Yeo, Farooqi, Luan, Aminian, Halsall, Keogh, Wareham, and O'Rahilly 2000). On this basis we examined the A1475G variant, with obese and healthy populations in Turkey.

As a result of the statistical analyzes, the A1475G polymorphism was significantly lower in obese subjects with G allele. There was no significant difference in allele frequencies between the control and obese groups. In addition, various metabolic and anthropometric parameters were compared in the patient and control groups. Weight, BMI, fat weight, fat percentage, TG values were significantly higher in the patient group. Again, HDL was lower in the patient group than in the control group. When these parameters were evaluated in terms of polymorphism relationship, no significant difference was found.

## CONCLUSION

In our study, A1475G polymorphism could not be shown to be associated with obesity. The frequency of AG genotype was significantly higher in the obese group than in the control group. Fasting blood glucose levels were significantly higher in obese subjects with G allele. More comprehensive and meaningful results will be obtained with the studies to be conducted in a wider sample.

## REFERENCES

Bray, George A. 1985. "Obesity: Definition, Diagnosis and Disadvantages." *Medical Journal of Australia* 142(SP7). https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/j.1326-5377.1985.tb116079.x (January 28, 2020).

Challis, Benjamin G., Giles S.H. Yeo, I. Sadaf Farooqi, Jian'an Luan, Shiva Aminian, David J. Halsall, Julia M. Keogh, Nicholas J. Wareham, and Stephen O'Rahilly. 2000. "The CART Gene and Human Obesity: Mutational Analysis and Population Genetics." *Diabetes* 49(5): 872–75.

Challis, Benjamin G, Giles S H Yeo, I Sadaf Farooqi, Jian Luan, Shiva Aminian, David J Halsall, Julia M Keogh, Nicholas J Wareham, and Stephen O Rahilly. 2000. "The CART Gene and Human Obesity." 49(May).

Deckelbaum, Richard J., and Christine L. Williams. 2001. "Childhood Obesity: The Health Issue." *Obesity Research* 9(S11): 239S-243S. http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2001.125 (January 28, 2020).

Douglass, J., A. A. McKinzie, and P. Couceyro. 1995. "PCR Differential Display Identifies a Rat Brain MRNA That Is Transcriptionally Regulated by Cocaine and Amphetamine." *Journal of Neuroscience* 15(3 II): 2471–81.

Douglass, James, and Sylvia Daoud. 1996. "Characterization of the Human CDNA and Genomic DNA Encoding CART: A Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript." *Gene* 169(2): 241–45.

Echwald, Søren M. et al. 1999. "Sequence Variants in the Human Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript (CART) Gene in Subjects with Early Onset Obesity." *Obesity Research* 7(6): 532–36.

Gautvik, Kaare M. et al. 1996. "Overview of the Most Prevalent Hypothalamus-Specific MRNAs, as Identified by Directional Tag PCR Subtraction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(16): 8733–38.

Kanbur, Nuray O, Orhan Derman, and Erol Kinik. "Prevalence of Obesity in Adolescents and the Impact of Sexual Maturation Stage on Body Mass Index in Obese Adolescents." *International journal of adolescent medicine and health* 14(1): 61–65. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467208 (January 28, 2020).

Koylu, Ersin O. et al. 1997. "Immunohistochemical Localization of Novel CART Peptides in Rat Hypothalamus, Pituitary and Adrenal Gland." *Journal of Neuroendocrinology* 9(11): 823–33.

Koylu, Ersin O., Burcu Balkan, Michael J. Kuhar, and Sakire Pogun. 2006. "Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART) and the Stress Response." *Peptides* 27(8): 1956–69.

Kuhar, M. J. et al. 2002. "CART Peptides." *Neuropeptides* 36(1): 1–8.

Lobstein, T., L. Baur, and R. Uauy. 2004. "Obesity in Children and Young People: A Crisis in Public Health." *Obesity Reviews, Supplement* 5(1): 4–104.

Miraglia Del Giudice, Emanuele et al. 2001. "Mutational Screening of the CART Gene in Obese Children: Identifying a Mutation (Leu34Phe) Associated with Reduced Resting Energy Expenditure and Cosegregating with Obesity Phenotype in a Large Family." *Diabetes* 50(9): 2157–60.

"Obezite." https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/obezite (February 2, 2020).

Pont-Kingdon, Genevieve, and Elaine Lyon. 2005. "Direct Molecular Haplotyping by Melting Curve Analysis of Hybridization Probes: Beta 2-Adrenergic Receptor Haplotypes as an Example." *Nucleic Acids Research* 33(10): 1–8.

Rosenbaum, M., and R. L. Leibel. 1989. "Obesity in Childhood." *Pediatrics in Review* 11(2): 43–55.

Salans, Lester B., Jerome L. Knittle, and Jules Hirsch. 1968. "The Role of Adipose Cell Size and Adipose Tissue Insulin Sensitivity in the Carbohydrate Intolerance of Human Obesity." *Journal of Clinical Investigation* 47(1): 153–65.

Soylu, A et al. 2000. "Effect of Socioeconomic Status on the Blood Pressure in Children Living in a Developing Country." *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 42(1): 37–42. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10703232 (January 28, 2020).

Tebbe, J. I. et al. 2004. "Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript Stimulates Colonic Motility via Central CRF Receptor Activation and Peripheral Cholinergic Pathways in Fed, Conscious Rats." *Neurogastroenterology and Motility* 16(4): 489–96.

Thim, L, P Kristensen, P J Larsen, and B S Wulff. 1998. "CART, a New Anorectic Peptide." *The international journal of biochemistry & cell biology* 30(12): 1281–84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924797 (February 1, 2020).

Wortley, Katherine E. et al. 2004. "Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript in the Arcuate Nucleus Stimulates Lipid Metabolism to Control Body Fat Accrual on a High-Fat Diet." *Regulatory Peptides* 117(2): 89–99.

# The effect of *Punica granatum, Camellia sinensis, Aloe vera* on the expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes in prostate cancer

Ayça Kanat[*1], Fatima Dedemoğlu[*1], Derin Buldanlı[2], Beril Bostancıoğlu[2], Seher Yılmaz[2], Sefa Kızıldağ[3]

[*1]Dokuz Eylul University, Health Sciences Institute, Department of Medical Biology and Genetics, Izmir, Turkey
[2]Izmir Private Turkish College, Izmir, Turkey
[3]Dokuz Eylul University, Medical Faculty, Department of Medical Biology, Izmir, Turkey

*Corresponding author e-mail: ayca.eylul.kanat@gmail.com/fatimadedemoglu@gmail.com

**Abstract**

Prostate cancer is the most fatal malignancy and one of the most common types of cancer in males.men. Traditionally, there have been studies using extracts from plant roots, stem and fruit to protect health, increase immunity, prevent and treat chronic diseases. In this study, we aimed to investigate the effect of *P. granatum*, *A. vera* and *C. sinensis* plant extracts dissolved in ethanol on apoptosis and cell growth and development in prostate cancer cells.

In our study, *P. granatum*, *A. vera* and *C. sinensis* plant extracts were applied to LNCaP prostate cancer cell line at different concentrations. After 48 hours of experiments, cell viability was determined to investigate the effect of extracts on the cells and changes in expression levels of anti-apoptotic/pro-apoptotic genes were determined by relative quantitation.

According to experimental results, BAX and BCLXL gene expressions were decreased in 1ul *C. sinensis*-treated cells and increased in all other cells. The BCL2/BAD ratio was decreased in cells treated with *C. sinensis* and 10ul *A. vera* and increased in other samples. BCLXL/BAD ratio decreased in cells given 1ul *C. sinensis* and increased in others. The BCL2/BAX ratio was decreased in cells treated with 1ul *C. sinensis*, 1ul *A. vera* and 10ul EtOH, and increased in other samples.

In conclusion; *P. granatum*, *C. sinensis* and *A. vera* extracts have been shown to be therapeutic agents against prostate cancer, and mechanisms need to be investigated in detail. To determine the optimum concentration of the components of *P. granatum*, *C. sinensis* and A. vera, in vivo investigations should be performed in addition to in vitro.

**Keywords:** prostate cancer, apoptosis, gene expression, *P. granatum, C. sinensis, A. vera*.

## INTRODUCTION

In our age, cancer is characterized by irregular cell proliferation and is one of the most deadly diseases in developed and developing countries. It is a disease that increases as a result of uncontrolled cell division of healthy cells in the body and spreads gradually in the body, damages other cells and is fatal when left untreated. Genetic factors, nutritional habits, smoking, radiation can cause this disease. (Ayele, 2018; PriyaMet al2015). Prostate cancer (7.1%), lung cancer (11.6%) and colorectal cancer (10.2%) are the top three types of cancer in males in the world ("Kanser tedavisinde Aloe veranın (Sarısabır) yeri nedir?," n.d.).

Various factors such as age, heredity, tobacco use, nutritional habits, hormones and inflammation are thought to be influential in its development. Some recent studies have shown that vitamins E and D, selenium, calcium and omega 3, 6 fatty acids have protective effects against the disease. However, the mechanism has not yet been clearly resolved. This shows that eating habits have important effects on disease prevention and treatment (Castillejos-Molina & Gabilondo-Navarro, 2016).

The treatment of cancer is performed in three ways: surgical intervention, chemotherapy and radiotherapy (Mittal et al 2013). The most effective cancer treatment of these methods is chemotherapy and radiation applications; however, these treatments can lead to highly toxic and fatal side effects (PriyaM et al., 2015). Studies have shown that only 50% of cancer patients survive; considering this situation, the search for a less toxic alternative treatment method has emerged. Although there have been hundreds of known chemical

variants of chemotherapeutic agents, drug studies with fewer side effects have not been found yet (Ayele, 2018).

An effective anticancer drug should selectively destroy the affected cells without damaging normal cells. Therefore, herbal treatment methods have come to the fore. Natural products, especially plants, are used in the treatment of various diseases from past to present. Studies have shown that these plants contain important secondary metabolites with anticancer and antimutagenic properties. Anticancer plants have therapeutic effects; by inhibiting cancer-activating enzymes, stimulating the DNA repair mechanism, increasing the production of protective enzymes, and increasing the activity of immune cells (Ayele, 2018).

*Punica granatum* is a small tree that grows mostly in Iran, the USA and India; but is found almost everywhere in the world and is a rich source of polyphenols (Alam et al2013; Bishayee et al.2016). All parts of the plant, including the edible part of the plant, fruit juice, seeds and flowers, were examined for possible healing effects, thus revealing their antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, hypolipidemic and hypoglycemic properties (Ceci et al., 2018). In a study examining melanoma effect of *Punica granatum* pericarp-derived extract, it was determined that this plant extract has antiproliferative and antiangyogenic potential. Different plant parts of *Punica granatum*, which are thought to have preventive and curative effects in obesity, atherosclerosis, hyperlipidemia, inflammation and bacterial infection.

*Aloe vera* is a plant belonging to Liliacea family which is thought to have antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant and antitumor properties. Due to the anthracin and anthraquinone components, anticancer properties are being studied. Some of these studies show that *Aloe vera* inhibits proliferation in cancer cells and increases apoptosis of cancer cells; however, these studies need to be increased and supported (Bar-Ya'akov et al. , 2019; Sepehr et al., 2014).

*Camellia sinensis* is richer in antioxidants than other tea forms, it consists of caffeine, minerals, trace amounts of vitamins, amino acids and carbohydrate polyphenols. In addition, many in vitro and in vivo studies have shown that *Camellia sinensis* supplementation increases collagen and elastin fiber content and thus provides an anti-wrinkle effect (Salehi et al., 2019; L. Wang & Martins-Green, 2014).

Apoptosis is one of the mechanism of cell death. The mitochondrial cell-death pathway is one of the major pathways responsible for apoptosis, involving the Bcl-22 family proteins; Bcl-2, Bcl-xl, Bax, and Bad (Boise et al., 1993; Oltvai et al., 1993). Cells doubly deficient for the pair of proapoptotic molecules Bax and Bad proved resistant to all tested intrinsic death pathway (Wei et al., 2001). In this pathway, antiapoptotic proteins are Bcl-2 and Bcl-xl, whereas proapoptotic proteins are Bax and Bad proteins. The balance between antiapoptotic and proapoptotic genes is therefore critical in determining the ultimate apoptotic rate; the greater the expression level of proapoptotic genes, the more likely the cell will die (Danial & Korsmeyer, 2004; Ferrandina et al., 2000; Gompel et al., 1994).

## MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in the Molecular Biology Genetics and Cell Culture Laboratories of Dokuz Eylül University.

### Determination of Extracts

As a result of the literature research, it was planned to establish three different experimental sets of *P. granatum*, *A. vera* and *C. sinensis* extract at different concentrations. Herbal extracts were purchased commercially (Onko Farma). The experimental setup and its properties are shown in Table 1.

During the research, herbal extracts applied to LNCaP prostate cancer cell line and their volumes are given in the table1. Ethanol was applied to the control group as the herbal extracts were dissolved in ethanol.

### Cell Culture Experiments:

During the cell culture studies, the LNCaP human prostate cancer cell line was used to see the effect of the extracts. These epithelial morphology cells are adherent (Mittal et al., 2013).

The LNCaP prostate cancer cell line, delivered in lyophilized form, was thawed under appropriate conditions and seeded into 25 cm2 flasks. Then cells cultured in RPMI-1640 medium (10% FBS) a 37 ° C and 5% CO2

incubator. The cells were observed daily on an inverted microscope according to the percentage of coating the flask surface, and passaging was performed when the cells covered three-quarters of the flask.
The cells were incubated for 24 hours in FBS-free nutrient medium to allow the same cell cycle to be stabilized. The cells were then divided into six well plates; 14 of them were tested at different concentrations of extracts. Other flasks were included in the experiments as a negative control considering the toxic effect of pure alcohol on the cells.

**Cell Viability**

Cells where different concentrations of extracts were applied were stained with trypan blue at the end of 0 and 48 hours, and the percentage of viability was determined by counting on Neubauer Lam.

**Detection of Expression Levels of Anti-Apoptotic and Pro-Apoptotic Genes by Real Time PCR**

Different concentrations of *P. granatum*, *A. vera* and *C. sinensis* were applied to the cell culture experiment sets and RNA isolation was performed with a commercial kit. The necessary purity and quantification were then performed by spectrophotometer
Total RNAs obtained from cell culture samples were converted to cDNA using Poly A tail splicing reaction. cDNA synthesis was performed in accordance with the manufacturer's instructions with the Script PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit ’
In our project, the expression levels of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes were determined with Real Time PCR (RotorGene device), SYBR Green detection method. The primers were purchased by the company in lyophilized form after being synthesized as indicated in Table 2 and purified by HPLC.
Primer sequences used for the investigation of expression changes of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes in cells where plant extracts are applied are given in the table.

**Tables and Figures**

**Table 1.** Cell Culture Experimental Groups and Properties

| Groups | *P. granatum* | *C. sinensis* | *A. vera* | EtOH (Control) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 ul | | | |
| 2 | 10 ul | | | |
| 3 | | 1 ul | | |
| 4 | | 10 ul | | |
| 5 | | | 1 ul | |
| 6 | | | 10 ul | |
| 7 | | | | 1 ul |
| 8 | | | | 10 ul |

**Table 2.** Primer Sequences

| | | |
|---|---|---|
| **HPRT** | Forward | 5’-GTGGAGATGATCTCTCAACT-3’ |
| | Reverse | 5’-ACATGATTCAAATCCCTGAAG-3’ |
| **BAX** | Forward | 5’-AAGAAGCTGAGCGAGT-3’ |
| | Reverse | 5’-GCCCATGATGGTTCTG-3’ |
| **BCL-XL** | Forward | 5’-GCTGGTGGTTGACT-3’ |
| | Reverse | 5’-GGATGGGTTGCCATTGA-3’ |
| **BCL-2** | Forward | 5’-TCAGGCTGCTTGGGATAAAGATG-3’ |
| | Reverse | 5’-GGCTTCTGGAGGACATTTGGA-3’ |
| **BAD** | Forward | 5’-GAGGTCCTGAGCCGACAG-3’ |
| | Reverse | 5’-CTTCCTCTCCCACCGTAGC-3’ |

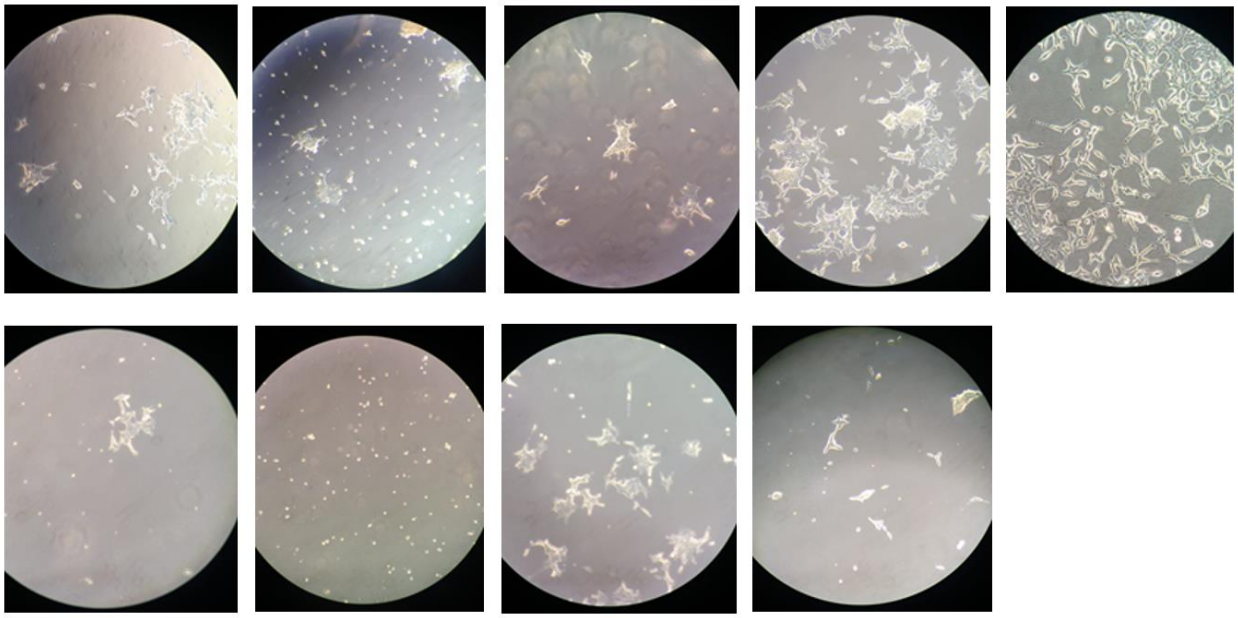


**Figure 1.** Top row from left to right; 72 h *P. granatum* 10ul, *C. sinensis* 10ul, *A. vera* 10ul, EtOH 10ul, 0h LNCaP cell. Bottom row left to right; *P. granatum* 1ul, *C. sinensis* 1ul, *A. vera* 1ul, EtOH 1ul

**Table 3.** Determination of Concentration and Time-dependent Cell Viability

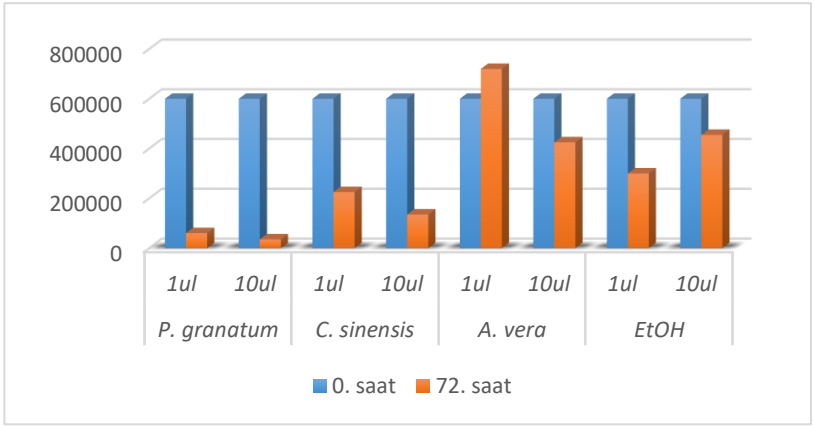



**Table 4.** Changes in the Expression of Pro-Apoptotic and Anti-Apoptotic Genes

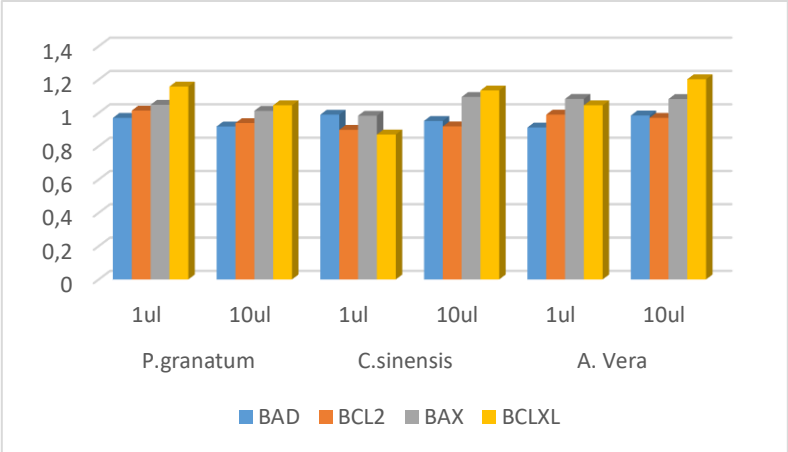
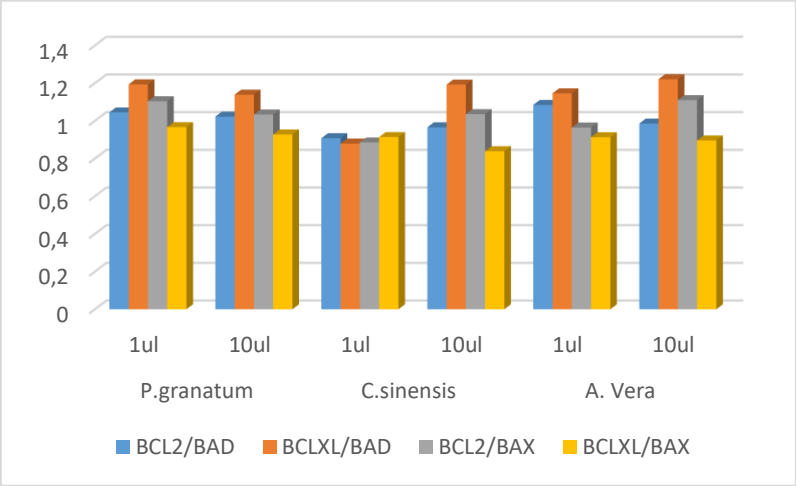


**Table 5.** Anti-apoptotic / Pro-apoptotic Gene Expression Ratios




## RESULTS

### Cell Viability

The effect of herbal extracts on cancer cell viability and expression of apoptotic genes has been investigated on LNCaP prostate cancer cell line (Figure 1).

Accordingly, 10 µl administration of *P. granatum* extract is the most inhibiting cell growth and viability compared to the microscope image taken at 0 h.

At the beginning and end of the experiments, cell viability was determined by staining the cells with trypan blue dye. As a result of live cell counts on the Neubauer slide, the results in Table 3 were obtained.

Cell viability count results are given in the table before applying herbal extracts to LNCaP cells and after 72 hours. *P. granatum* extract seems to have the greatest effect on cell viability compared to others.

According to the results of cell viability count at the end of 72 hours, 10 µl of *P. granatum* was found to be the most inhibiting extract compared to other extracts. Cell viability assay tests support the microscope images. It was observed that cell growth and development unexpectedly increased in cells treated with 1 µl of *A. vera* extract.

### RNA Isolation

RNAs isolated from cells seeded in six well plates at 0 hr and cells where extracts of different concentrations were applied at the end of 72 h were analyzed on spectrophotometer and their purity checked. Accordingly, the concentration of 8 RNA samples was in the range of 1-3 µg / ml

### Determination of Expressions of Anti-apoptotic and Pro-Apoptotic Genes

Changes in the expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes were investigated by performing a relative quantitation in Real Time PCR device with Sybr Green detection. Accordingly, the rates of change in the expression levels of the 4 genes compared to the reference housekeeping gene product are shown in Tables 4 and 5. As a result of, BAD gene expression decreased in all samples. BCL2 gene expression increased in control cells and cells treated with 1µl *P. granatum* while expression level decreased in cells treated with other factors. BAX and BCLXL gene expressions decreased in cells treated with 1µl *C. sinensis* and increased in all other cells. Considering the pro-apoptotic and anti-apoptotic gene expression rates; BCL2 / BAD ratio decreased in cells given *C. sinensis* and 10ul *A. vera* and increased in other samples. BCLXL / BAD ratio decreased in cells given 1µl *C. sinensis* and increased in others. BCL2 / BAX ratio decreased in cells given 1 µl *C. sinensis* and 1 µl A. vera, increased in other samples. BCLXL / BAX ratio decreased in all samples.

**DISCUSSION**

Pomegranate is a fruit that has been recognized since ancient times, providing numerous therapeutic benefits through different mechanisms. Potential therapeutic effects of pomegranate are due to antioxidant, anticarcinogenic and anti-inflammatory properties (Yılmaz, 2010). In this study, it was aimed to determine the changes in cell viability and expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes as a result of application of *P. granatum*, *A. vera* and *C. sinensis* herbal extracts in different concentrations to LNCaP prostate cancer cell line. Apoptosis and cell viability were investigated by applying 3 herbal extracts in the prostate cancer cell line, which may be important for cancer treatment.

In vitro studies with *P. granatum*, which is rich in polyphenolic compounds, showed that the growth and development of cancer cells were suppressed and apoptosis was induced in the cells. In HT-29 colon cells treated with 100 /g / ml *P. granatum* extract, the herbal extract inhibited the growth and proliferation of cancer cells by showing strong antioxidant effect (Akbulut et al. 2010). In a study examining the effects of this extract on prostate cancer, it was also found that apoptosis was induced in cells (Yılmaz, 2010). The most abundant polyphenols in pomegranate juice have been shown to inhibit the growth of prostate cancer cells (in vitro) in humans (Pantuck et al., 2006).

Androgen and its receptors are vital for prostate cancer formation and development. According to a study, pomegranate extract and its juice decreased the level of expression of genes associated with androgen biosynthesis. It was observed that ethanolic *P. granatum* extract applied to prostate cancer cell line decreased androgen biosynthesis and testosterone concentration (Turrini et al., 2015).

In another study examining the time and concentration-dependent effects of the extract, the fibrosarcoma cancer WEHI-164 cell line was treated with *P. granatum* extract at a concentration range of 10-500 /g / ml. After the determination of cell viability and protein levels at 24 and 48 hours, it was concluded that this extract inhibited the growth and development of cancer cells depending on the dose (Sepehr et al., 2014).

In another study researchingthe effect of concentration, the anti-proliferative and pro-apoptotic properties of *P. granatum* extract were evaluated in human prostate cancer cells. As a result of the experiments which lasted for 48 hours with the extract applied in the concentration range of 10 - 100 /g / ml, it was observed that the dose-dependent cell viability and growth of PC3 prostate cancer cells were inhibited. In addition, induction of BAX and BAD pro-apoptotic genes and decreased expression of BCLXL and BCL2 anti-apoptotic genes have been determined (Malik et al., 2005). In our study, BAD gene expression decreased and BAX and BCLXL gene expression increased in *P. granatum* treated cells. And also; While BCL2 expression was increased in 1ul *P. granatum* treated cells, BCL2 expression was decreased in 10µl *P. granatum* treated cells.

In a study investigating the effect of punicalagin component, one of the polyphenolic components in *P. granatum* extract, on U87MG glioma cells, both apoptosis and autophagy were induced depending on the concentration of the component and cell viability decreased accordingly. In the present study, the effects of the extract obtained from *P. granatum* seeds and fruits were examined, and similar to the above-mentioned studies, it was observed that the effects of cell viability were reduced depending on the concentration. In future studies, the effect of polyphenols contained in *P. granatum* content is planned to be tested separately (S. G. Wang et al., 2013) .

*C. sinensis* is another herbal extract that is thought to have an effect on cells due to the rich phenolic components it contains. In one study, the potential anti-tumor effect of this extract on breast cancer cells was investigated. The plant extract were applied in breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 at a concentration range of 31.5 /g / ml to 1 mg / ml and cell viability was determined at 24 and 48 hours. In addition, p53 protein, a tumor suppressor gene product, was examined by western blot analyzes. It was found that the extract showed cytotoxic effect in the tests after 24 hours and the level of p53 protein was increased. In our study, changes in expression levels of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes were determined by relative quantitation. As a continuation of our study, we are planning to support our results with western blot analysis (Costa et al., 2019).

In a study examining the anticancer effect of *C. sinensis* extract in the colon carcinoma cell line Coco-2 and mouse normal fibroblast L929 cell line, plant extracts were applied in a concentration range of 50 - 800 /g /

ml. As a result, it was found that *C. sinensis* at a concentration of 800 /g / ml significantly inhibited cell growth (Esghaei et al., 2018).

In a study examining the effects of *C. sinensis* extract applied to squamous cell carcinoma SCC line in terms of cell viability, a statistically significant difference was found in the cell viability of the malignant cells to which the extract was applied (Khozaymeh et al. , 2017). In our study, BAD and BCL2 gene expressions were found to be decreased in *C. sinensis* treated cells. In addition, BAX and BCLXL expression was increased in 1 µl *C. sinensis*-treated cells and decreased in 10 µl *C. sinensis*-treated cells.

Many studies have concluded that *A. vera* has biological benefits such as wound healing, anti-cancer and anti-oxidant properties (Kim et al., 2019). In a study, the cell viability determination of Hela and SiHa cancer cells treated with aloe-emodin component at different concentrations in the leaves of *A. vera* plant and determination of cell growth and apoptosis by flow cytometric analyzes were investigated. As a result, the extract was shown to induce apoptosis in cells (Gao et al., 2019). In our study, expression levels of BCXL and BAX genes increased while BAD and BCL2 expression levels decreased in *A. vera* treated cells.

## CONCLUSION

In our study, apoptosis and cell viability were investigated by applying three herbal extracts in the prostate cancer cell line, which may be important for cancer treatment. In conclusion; *P. granatum*, C. sinenesis and *A. vera* extracts have been shown to be therapeutic agents against prostate cancer, and mechanisms need to be investigated in detail. To determine the optimum amount of the components of *P. granatum*, *C. sinensis* and A. vera, in vivo investigations should be performed in addition to in vitro studies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

LNCaP prostate cancer cell line used during the experiments was taken from Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz, Ege University Bioengineering Department, Izmir - Turkey.

## REFERENCES

Akbulut, G., Yildiz, A., & Yalinca, R. (2010). Nar: Bile imi ve Potansiyel Sa l k Etkileri. In *Kafkas Üniv Fen Bil Enst Derg* (Vol. 3).

Alam, S., Katiyar, D., Goel, R., Vats, A., & Mittal, A. (2013). Role of herbals in cancer management. In *The Journal of Phytopharmacology* (Vol. 2). Retrieved from www.phytopharmajournal.com

Ayele, T. T. (2018). A Review on Traditionally Used Medicinal Plants/Herbs for Cancer Therapy in Ethiopia: Current Status, Challenge and Future Perspectives. *Organic Chemistry: Current Research*, *07*(02). https://doi.org/10.4172/2161-0401.1000192

Bar-Ya'akov, I., Tian, L., Amir, R., & Holland, D. (2019, April 16). Primary metabolites, anthocyanins, and hydrolyzable tannins in the pomegranate fruit. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00620

Bishayee, A., Mandal, A., Bhattacharyya, P., & Bhatia, D. (2016). Pomegranate exerts chemoprevention of experimentally induced mammary tumorigenesis by suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. *Nutrition and Cancer*, *68*(1), 120–130. https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1115094

Boise, L. H., González-García, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., … Thompson, C. B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, *74*(4), 597–608. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90508-N

Castillejos-Molina, R. A., & Gabilondo-Navarro, F. B. (2016). Prostate cancer. *Salud Publica de Mexico*, *58*(2), 279–284. https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7797

Ceci, C., Lacal, P. M., Tentori, L., De Martino, M. G., Miano, R., & Graziani, G. (n.d.). *Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid*. https://doi.org/10.3390/nu10111756

Costa, D., Santos, R., Andrade, E. D. S., Themistocles, B. L., Silva, B. G. da, Fialho, E., … Daleprane, J. (2019). Green Tea Extract (*Camellia sinensis*) as a Potential Antitumoral Agent on Breast Cancer Cells (FS13-04-19). *Current Developments in Nutrition*, *3*(Supplement_1). https://doi.org/10.1093/cdn/nzz030.fs13-04-19

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004, January 23). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, Vol. 116, pp. 205–219. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7

Esghaei, M., Ghaffari, H., Esboei, B. R., Tapeh, Z. E., Salim, F. B., & Motevalian, M. (2018). Evaluation of anticancer activity of *Camellia sinensis* in the Caco-2 colorectal cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *19*(6), 1697–1701. https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.6.1697

Ferrandina, G., Mozzetti, S., Marone, M., Fagotti, A., Macchia, G., Mancuso, S., & Scambia, G. (2000). Bcl-2, bax, bcl-x(L) and bcl-x(S) expression in neoplastic and normal cervical tissue. *Cancer Letters*, *155*(1), 19–27. https://doi.org/10.1016/s0304-3835(00)00393-1

Gao, R., Wu, X., Huang, Z., Wang, B., Li, F., Xu, H., & Ran, L. (2019). Anti-tumor effect of aloe-emodin on cervical cancer cells was associated with human papillomavirus E6/E7 and glucose metabolism. *OncoTargets and Therapy*, *12*, 3713–3721. https://doi.org/10.2147/OTT.S182405

Gompel, A., Sabourin, J. C., Martin, A., Yaneva, H., Audouin, J., Decroix, Y., & Poitout, P. (1994). Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *The American Journal of Pathology*, *144*(6), 1195–1202. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8203460

Kanser tedavisinde Aloe veranın (Sarısabır) yeri nedir? (n.d.). Retrieved January 14, 2020, from https://www.drozdogan.com/kanser-tedavisinde-aloe-veranin-sarisabir-yeri-nedir/

Khozaymeh, F., Golestannejad, Z., Shirzad, M., & Mojtahedi, N. (2017). Original Study GROWTH INHIBITION AND CYTOTOXICITY EFFECT OF GREEN TEA EXTRACT ON SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE : AN IN VITRO STUDY. *Annals of Dental Specialty*, *5*(3), 89–92.

Kim, M. W., Kang, J. H., Shin, E., Shim, K. S., Kim, M. J., Lee, C. K., … Oh, S. H. (2019). Processed: *Aloe vera* gel attenuates non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced small intestinal injury by enhancing mucin expression. *Food and Function*, *10*(9), 6088–6097. https://doi.org/10.1039/c9fo01307e

Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., & Mukhtar, H. (2005). Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(41), 14813–14818. https://doi.org/10.1073/pnas.0505870102

Mittal, A., Alam, S., Katiyar, D., Goel, R., & Vats, A. (2013). Role of herbals in cancer management. In *The Journal of Phytopharmacology* (Vol. 2). Retrieved from www.phytopharmajournal.com

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death. *Cell*, *74*(4), 609–619. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-O

Pantuck, A. J., Leppert, J. T., Zomorodian, N., Aronson, W., Hong, J., Barnard, R. J., … Belldegrun, A. (2006). Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, *12*(13), 4018–4026. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2290

PriyaM, L., PriyaK, B., & Subbaiah Kotakadi, V. (2015). Herbal and Medicinal Plants Molecules Towards Treatment of Cancer: A Mini Review. *American Journal of Ethnomedicine*, *2*(2). Retrieved from www.ajethno.comhttp://www.ajethno.com

Salehi, B., Fokou, P. V. T., Yamthe, L. R. T., Tali, B. T., Adetunji, C. O., Rahavian, A., … Sharifi-Rad, J. (2019, July 1). Phytochemicals in prostate cancer: From bioactive molecules to upcoming therapeutic agents. *Nutrients*, Vol. 11. https://doi.org/10.3390/nu11071483

Sepehr, K. S., Baradaran, B., Mazandarani, M., Yousefi, B., Alitappeh, M. A., & Khori, V. (2014). Growth-inhibitory and apoptosis-inducing effects of Punica Granatum L. var. spinosa (apple punice) on fibrosarcoma cell lines. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *4*, 583–590. https://doi.org/10.5681/apb.2014.086

Turrini, E., Ferruzzi, L., & Fimognari, C. (2015). Potential effects of pomegranate polyphenols in cancer prevention and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2015. https://doi.org/10.1155/2015/938475

Wang, L., & Martins-Green, M. (2014, August 25). Pomegranate and its components as alternative treatment for prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 15, pp. 14949–14966. https://doi.org/10.3390/ijms150914949

Wang, S. G., Huang, M. H., Li, J. H., Lai, F. I., Lee, H. M., & Hsu, Y. N. (2013). Punicalagin induces apoptotic and autophagic cell death in human U87MG glioma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(11), 1411–1419. https://doi.org/10.1038/aps.2013.98

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., … Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, *292*(5517), 727–730. https://doi.org/10.1126/science.1059108

Yılmaz, B. (2010). Therapeutic use of pomegranate (*Punica granatum*). *Turkiye Aile Hekimligi Dergisi*, *14*(3), 146–153. https://doi.org/10.2399/tahd.10.146

# Investigation of Antimicrobial, Antibiofilm and Cytotoxic Activities of Some Disinfectant Agents

Pervin Soyer[1*], Yağmur Tunalı[1]

[*1]Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Eskişehir, Turkey.

*pervinsoyer@gmail.com

**Abstract**

Disinfectants are diverse group of chemicals which reduces the number of microorganisms present in different media. The disinfectant agents used for this study; benzalkonium chloride, triclosan (ırgasan) and methylisothiazolinone. Benzalkonium chloride is quaternary ammonium salt. It is an anti-infective agent that dissolves quickly and used for a long time. They can be bacteriostatic or bactericidal, depending on their dissolved concentration. Triclosan and methylisothiazolinone are widely used in antimicrobial soaps. Antimicrobial chemicals are known as antimicrobial potentials substances that reduce growth of microorganisms. Antimicrobial, antibiofilm properties and cytotoxic effects of the selected disinfectant agents were investigated. The antimicrobial and antibiofilm effects of disinfectant agents were determined by agar well diffusion, microbroth dilution (Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) and Minimum Eradication Concentration (MBEC) against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Eschericia coli* ATCC 25922, *Enterecoccus feacalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* NRRL B478, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida krusei* ATCC 6258. Disinfectant agents exhibited a broad antimicrobial spectrum by agar well diffusion method. MICs of disinfectant agents for selected microorganisms ranged between 7.81-250µg/mL and MBECs were 15.62-1000 µg/mL. Additionally, for the cytotoxic determination brine shrimp method was used. And the results provided that, only benzalkonium chloride and triclosan (ırgasan) at 125-1000 µg/mL concentration was effective against *Artemia salina* model organism.

**Keywords:** Benzalkonium chloride, Triclosan, Methylisothiazolinone.

## INTRODUCTION

Disinfection is the process of destroying pathogenic microorganisms on inanimate substances or on the surface. Disinfection is defined as the "process that does not kill all microorganisms but reduces it to an acceptable level for the specified purpose" by British Standards Institute. Disinfectants are chemicals used for the disinfection of devices or materials that may be a source of contamination areas where pathogenic microorganisms are suspected or present. Antisepsis is the process of killing pathogenic microorganisms on the surface of the body.

Benzalkonium chloride is quaternary ammonium salt. It is an anti-infective agent, against bacteria, fungi, protozoa and viruses. They can be bacteriostatic or bactericidal, depending on their dissolved concentration. The exact mechanism of bacterial action is not yet known, but is based on enzyme inactivation. Enzyme activity increases with increases in temperature and pH. Gram-positive bacteria are more sensitive to disinfectants, pH changes than Gram-negative bacteria. Benzalkonium chloride has a wide range beneficial properties (Marple et al., 2004). Since 1935, they have been used as an antibacterial agent on surfaces, hand and face disinfection. In addition, low concentrations are also used as preservatives against microbial reproduction in drugs such as eye drops. It is also a cationic germicide. It is also used as insecticide and antimicrobial in the textile industry (Sun and Sun, 2001). Benzalkonium chloride, which has a concentration of 0.01-0.05%, is a bactericidal cationic substance used in various medical preparations as a preservative against microorganisms (Bernstein, 2000). Triclosan and methylisothiazolinone are known as antimicrobial agents that reduce growth of microorganisms. Today, different ingredients are used in antimicrobial products and are sold with different types of formulations such as liquid, powder, spray. Triclosan is used as an active ingredient in hand soaps, toothpastes, household chemicals and wet wipes. It has also antiviral and antifungal activities. Methylisothiazolinone is used as an antimicrobial protective agent in cosmetic products such as hand and face lotion, moisturizer, sun lotion. In water systems, methylisothiazolinone is used as a preservative against bacteria, fungi, biofilm structure of microorganisms and algae. Methylisothiazolinone is also found in

general household chemicals, carpet, dish and floor cleaning products. According to these informations, antimicrobial, antibiofilm properties and cytotoxic activity of disinfectant agents were determined in this study.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Agar Well DiffusionMethod

MHA (Mueller Hinton Agar) for bacteria and SDA (Saboroud Dextrose Agar) for yeast cultures were poured into sterile Petri dishes (15 mL each) and 100 µL of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Eschericia coli* ATCC 25922, *Enterecoccus feacalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* NRRL B478, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida krusei* ATCC 6258 ($1x10^8$ colony-forming unite [CFU]/mL) were dispersed on the surface of each agar plate. The wells were punctured and filled with aliquots of 50 µL of benzalkonium chloride, (B) triclosan (ırgasan)(I), methylisothiazolinone (M) disinfectant substances and for control group ketoconazole (for yeasts), chloramphenicol (for bacteria). After incubation at 37°C for 24 h, the inhibition zones against microbial growth were estimated.

### 2. Microbroth Dilution Method

Disinfectant substances were dissolved and concentrations were prepared on ranging from 0.4 to 1000 µg/mL in 96-well microplates. On these 100 µL disinfectant substances, 100 µL of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Eschericia coli* ATCC 25922, *Enterecoccus feacalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* NRRL B478, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida krusei* ATCC 6258 ($1x10^8$ colony-forming unite [CFU]/mL) were inoculated and microplates were incubated at 37°C for 24 h. Ketoconazole(Keto) for fungi and chloramphenicol (Chl) for bacteria cultures were also used as a control group concentrations ranging from 0.4 to 1000 µg/mL. After incubation period wells were stained by 20 µL resazurin dye to observe the color difference between dead and living cells. The test was run in triplicate and averaged (CLSI, 2009; Anderws, 2001) .

### 3. Biofilm Eradication Assay

Microbial biofilms are communities of microorganisms that embedded in a self-producing matrix, forming on living and nonliving surfaces. The inhibition effect of disinfectant substances on biofilm formation was evaluated in 96-well microplates. Firstly, 200 µL of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albicans* ATCC 90028 ($1x10^8$ colony-forming unite [CFU]/mL) cultures were inoculated and incubated at 37°C for 48 h, for forming biofilm at the bottom of the wells. After incubation period wells were gently washed two times with 200 µL of 0.9% NaCl solution. Then, 200 µL of disinfectant substances which were prepared on ranging from 0.4 to 1000 µg/mL were added to each wells and incubated at 37°C for 24 h. After incubation period wells were stained by 20 µL resazurin dye. The test was run in triplicate and averaged (Teanpaisan et al., 2017; Cruz et al., 2018; Chaieb et al., 2011).

### 4. Brine Shrimp Lethality Test

This cytotoxicity bioassay was performed in a 96-well microplate using nauplii of the Brine shrimp *Artemia salina*. Commercially sold Artemia mix were used. 18 g of Artemia mix were poured to the 500 mL of distilled water and incubated for 48 and 52 h. After larvae had seen they were taken and counted. Brine Shrimp lethality bioassay was determined with disinfectant substances concentrations ranging from 0.4 to 1000 µg/mL. 100 µL of substances and 10 of *Artemia salina* larvae were added in each well. After 24 hours incubation period, alive larvae were counted. The test was run in triplicate and averaged (Meyer et al., 1982).

## RESULTS and DISCUSSION

The inhibition zone results after 24 h incubation period were determined by measuring of inhibition zones diameters. The results are shown in **Table 1.** *Pseudomonas aeruginosa* in bacteria group and *Candida krusei* in yeast group are more sensitive than other microorganism cultures. Tested disinfectant substances (B,I,M) demonstrated different inhibition zones mean with different effects on standard microorganisms except of triclosan (ırgasan) against *E.coli*.

***Table 1.** Inhibiton zone diameters (mm)

| | ***S.aureus*** | ***E.coli*** | ***E.feacalis*** | ***P.aeruginosa*** | ***B.subtilis*** | ***L. monocytogenes*** | ***S. epidermidis*** | ***C.albicans*** | ***C.krusei*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **B (2mg)** | 7 | 6 | 5 | 7 | 8 | 7 | 9 | 5 | 9 |
| **I (2mg)** | 6 | Not effective | 6 | 15 | 5 | 6 | 7 | 15 | 15 |
| **M (2mg)** | 6 | 7 | 8 | 15 | 11 | 13 | 7 | 6 | 13 |
| **Chl (1 mg)** | 13 | 5 | 4 | 9 | 11 | 11 | 9 | - | - |
| **Keto(1mg)** | - | - | - | - | - | - | - | 7 | 15 |

*The test was run in triplicate and averaged.

The MIC values of disinfectant substances were tested from 0.4 to 1000 µg/mL concentrations. The results are shown in **Figure 1.** All of the tested disinfectant substances showed inhibition effects with different concentrations.

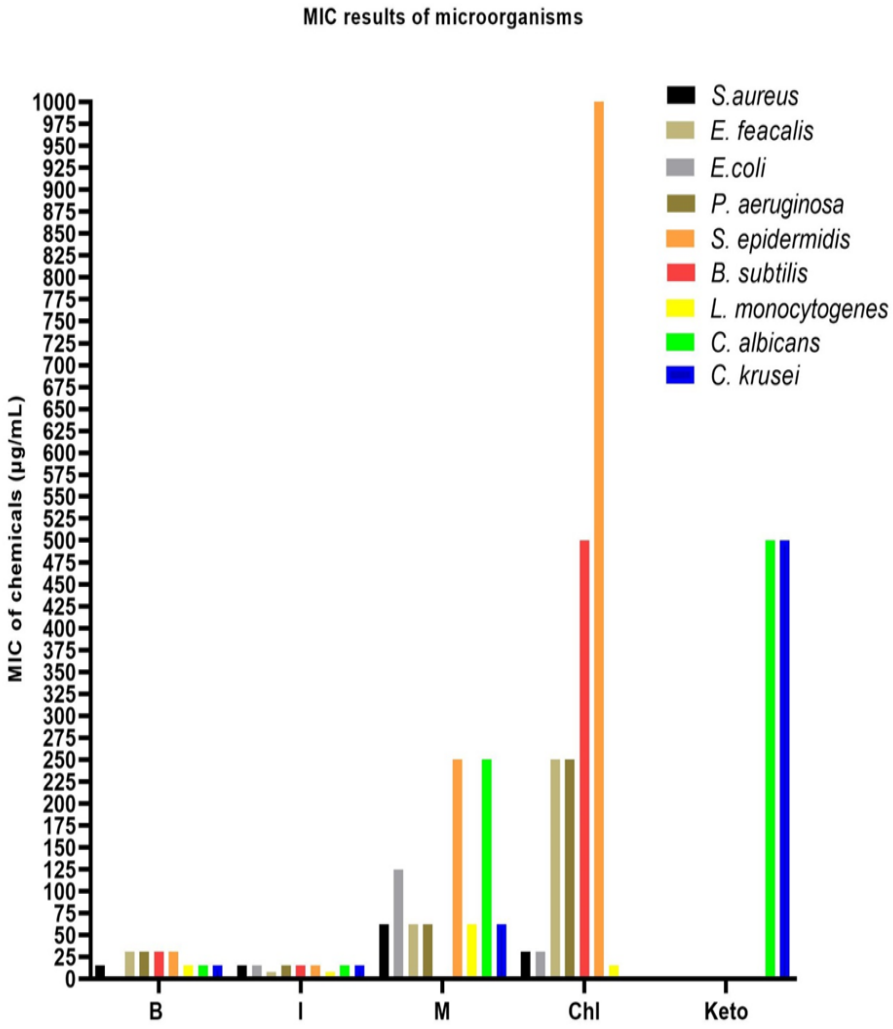



**Figure 1.** MIC values of disinfectant substances

Antibiofilm studies demonstrated a dose-dependent activity. The antibiofilm activity of disinfectant substances were examined by minimum biofilm eradication concentration (MBEC). The results are shown in **Table 2.** Triclosan (ırgasan) was not effective as other disinfectant substances on tested microorganisms.

**Table 2.** MBEC values of disinfectant substances

| MBEC values (µg/mL) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***Staphylococcus aureus*** | ***Staphylococcus epidermidis*** | ***Pseudomonas aeruginosa*** | ***Candida albicans*** |
| **B** | Not effective | 62.5 | 125 | 15.62 |
| **I** | 31.25 | Not effective | Not effective | Not effective |
| **M** | 15.62 | 250 | 62.5 | 1000 |

For the determination of Brine Shrimp Lethality Test results, *Artemia salina* larvae are counted out of 10 larvae after treated with disinfectant substances. The results are shown in **Figure 2.** Methylisothiazolinone did not show lethal effect on *Artemia salina* larvae.

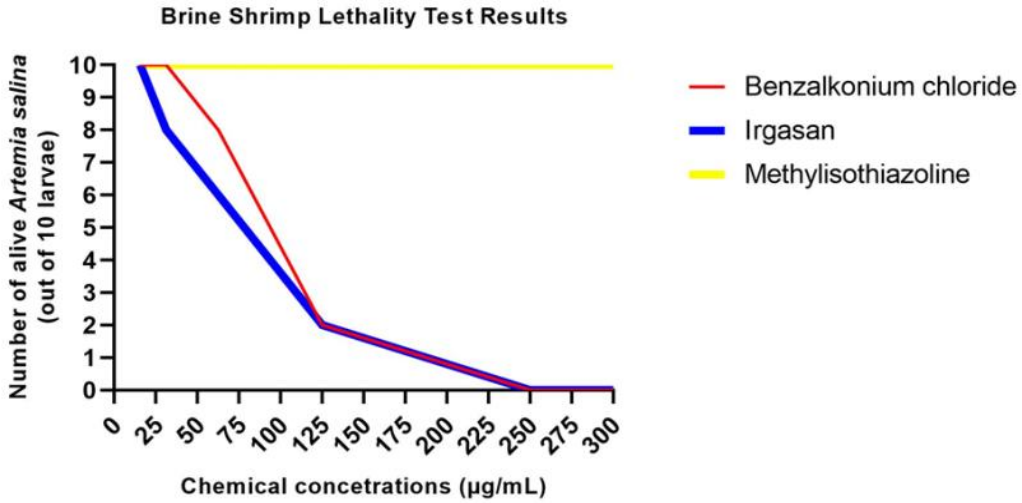



**Figure 2.**Results of the Brine shrimp lethality test

## CONCLUSION

In this research, within the scope of antimicrobial tests, Agar Well Diffusion and Microdilution methods have been applied to disinfectant substances against standard pathogenic microorganisms to determine effective substances and exact concentrations of disinfectants. By the results of these tests, benzalkonium chloride, triclosan (ırgasan) and methylisothiazolinone disinfectant substances were showed valuable effects in terms of antibacterial and antifungal at different concentrations. Antibiofilm effect of disinfectant active substances against biofilm structures was also investigated with biofilm eradication test. As a result of this test, necessary concentrations of disinfectant substances were determined to inhibit the biofilm structure. It is known that many disinfectants, antiseptics and antimicrobial chemicals used today have carcinogenic and cytotoxic properties. For this reason, it has been observed with Brine Shrimp Lethality test whether the disinfectant active substances used are harmful to human, animal and environmental health. Triclosan (ırgasan) and methylisothiazolinone showed cytotoxic effects against model organism *Artemia salina*, while benzalkonium chloride did not. As the concentration of disinfectant increases, the number of affected microorganisms and the damaging effect on microorganisms increase. However, after the concentration reaches the optimum level, the efficacy of disinfectant is not increased. Each disinfectant has the optimal concentration. In the present research, optimal concentrations of benzalkonium chloride, triclosan (ırgasan) and methylisothiazolinone disinfectant substances were determined for antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by Anadolu University Scientific Research Projects (BAP) Commission. Project number is 1805S193. We greatly acknowledge the financial support.

**REFERENCES**

Anderws JM 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48: 5-16.

Bernstein IL 2000. Is the use of benzalkonium chloride as a preservative for nasal formulations a safety concern? A cautionary note based on compromised mucociliary transport. Journal Of Allergy And Clinical Immunology, 105(1): 39-44.

Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A 2011. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. BMC Complementary Alternative Medicine, 11: 29.

CLSI, 2009 .Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing informational supplement M100-S19. Available at: https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf [19.03.2020]

Cruz CD, Shah S, Tammela P 2018. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. BMC Microbiology, 173: 1–9.

Marple B, Roland P, Benninger M 2004. Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 130(1): 131-141.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Journal of Medicinal Plants Researh, 45: 31-34.

Sun Y, Sun G 2001. Novel regenerable N-halamine polymeric biocides. I. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of hydantoin-containing polymers. Journal of applied polymer science, 80(13): 2460-2467.

Teanpaisan R, Kawsud P, Pahumunto N, Puripattanavong J 2017. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. Journal of Traditional Complementary Medicine, 7(2): 172-177.

# Melaminin DNA ile etkileşiminin incelenmesi

Ali Şenol[1**], Alparslan Kadir Devrim[1]

[1]Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

*Bu çalışma, birinci yazarın ikinci yazarın danışmanlığında Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde hazırladığı yüksek lisans tezinin bir kısmından üretilmiştir.
**Sorumlu yazar e-mail: vetalisenol@gmail.com

## Özet
Melamin, azot içeriği yüksek bir endüstriyel madde olup, daha fazla kâr elde etmek isteyen bazı üretici firmalarca yasa dışı olarak protein içeriğinin arttırılması amacıyla, süt, süt ürünleri, bebek ve evcil hayvan mamaları ve çiftlik hayvanı yemlerine eklenebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, organizmaya gıda yolu ile alınan melamin, idrar kesesinde taş oluşumu, inflamasyon ve hiperplazi başta olmak üzere tubuler blokaj ve böbrek yetmezliği gibi nefrolojik bozukluklara sebebiyet vermektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), deney hayvanlarında melamin kanserojenitesi için yeterli kanıt bulunduğunu bildirmiştir. Bu çalışmanın amacı melaminin, genomik DNA molekülleri üzerine etkisinin incelenmesidir. Bu kapsamda beş farklı konsantrasyonda (0.62, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mM) hazırlanan melaminin, sığır timus dokusundan izole edilen genomik DNA (2800 ng/µl) örnekleri ile etkileşimi UV absorbans spektrofotometri yöntemi ile 230-320 nm dalga boyları arasında değerlendirildi. Melamin konsantrasyonundaki artışa paralel olarak dalga piklerinin yükseldiği gözlendi. Hiperkromik etki olarak adlandırılan bu durumun, genomik DNA ile melamin molekülleri arasında oluşan bir bağlanmadan ortaya çıktığı ve etkileşimin groove bağlama yoluyla oluşabileceği sonucuna varıldı.
**Anahtar Kelimeler:** DNA, Melamin, UV absorbans spektrofotometri, Groove bağlanma

# Investigation on Interaction of melamine with DNA

## Abstract
Melamine is an industrial substance with a high nitrogen content and can to be added milk, dairy products, baby and pet foods and farm animals feeds in order to increase the protein content illegally by the producers companies who want to make more profit. According to World Health Organization (WHO) data, melamine, which is taken into the organism via food, causes nephrologic disorders such as, inflammation, hyperplasia and stone formation in the urinary bladder, tubular blockage and renal failure. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has reported sufficient evidence for melamine carcinogenicity in experimental animals. The aim of this study is to investigate the effect of melamine on genomic DNA molecules. In this context, the interaction of melamine prepared in five different concentrations (0.62, 1.25, 2.5, 5 and 10 mM) with genomic DNA (2800 ng/µl) samples isolated from bovine thymus tissue was evaluated by UV absorbance spectrophotometry method between 230-320 nm wavelengths. Wave peaks increased in parallel with the increase in melamine concentration. It is concluded that this condition, called hyperchromic effect, arises from a binding between genomic DNA and melamine molecules and the interaction can be formed by groove binding.
**Keywords:** DNA, Melamine, UV absorbance spectrophotometry, Groove binding

## GİRİŞ
Melamin (1.3.5-triazin-2.4.6-triamino-1, $C_3H_6N_6$), ilk olarak 1834 yılında Alman kimyager Justus Von Liebig tarafından potasyum tiyosiyonatın amonyum klorid ile ısıtılması ile sentezlenmiş, siyanüramid veya triaminotriazin olarak da adlandırılan bir kimyasaldır (FDA, 2008; Acar 2014). Genel anlamda laminantlar, tutkallar, temizlik ürünleri, yemek kapları, çeşitli endüstriyel ve ticari uygulamalarda kullanılan uzun ömürlü organik bir bileşiktir. Aslında endüstriyel bir ürün olan melamin, yüksek azot içermesinden dolayı buğday gluteni, süt, süt tozu, bebek maması ve hayvan yemleri gibi birçok gıdaya yasa dışı olarak katılmış ve protein oranı yüksek gösterilerek tüketime sunulmuştur (Shen ve ark., 2010b; Dorne ve ark., 2013). Tüketilebilir gıda değeri olmayan melamin ile kontamine gıdaları tüketen bebek ve hayvanlarda, sağlık açısından problemler ortaya çıkmaya başlamış ve 2007 yılında büyük patlak vermiştir. Çin'de yaşanan bu olayda toplam 54.000

çocuk etkilenmiş, 6000'i ciddi şekilde rahatsızlanmış ve 6'sı ölmüştür. Aynı durumdan etkilenen 1000'den fazla hayvanın da böbrek yetmezliğine bağlı öldüğü tahmin edilmektedir (WHO, 2009; Puschner ve Reimschuessel, 2011). Gıdalarda yapılan araştırmalarda melamin varlığının tespit edilmesi üzerine, istemsizce maruz kalınan melaminin sebep olduğu patolojik bozuklukların ve DNA üzerindeki etki mekanizmasının açıklanmasına yönelik araştırmalar hız kazanmış ve moleküler tekniklere olan ilgi artmıştır.
Özellikle küçük moleküllü bileşiklerin bağlanması için iyi bir hedef olan DNA'nın yapısal özelliklerini, gen mutasyonunu, bazı hastalıkların kökenini, antitümöral ve antiviral ilaçların etki mekanizmasını anlayarak yeni ve daha verimli DNA hedefli ilaçları tasarlamak için, bileşiklerin DNA üzerindeki etkileşimi birçok yöntem ile aydınlatılmaya çalışılmıştır (Long and Barton, 1990; Sun ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2010; Xie ve ark., 2015). Genel anlamda bileşikler ile DNA arasındaki etkileşimin üç şekilde olabileceği bildirilmiş ve bu etkileşimlerin interkalasyon, groove bağlama ve elektrostatik etkileşim şeklinde olabileceği belirtilmiştir (Paternack ve ark., 1983; Kumar ve Arunachalam, 2006; Wang ve Zhou, 2007; Shen ve ark., 2010a). Bu çalışma, üretici firmalar tarafından gıdalara hile olarak katılan ve istemsizce uzun süre maruz kalınan melaminin, DNA ile olan etkileşimini belirlemeye yönelik yapılmış olup, moleküller arası etkileşim UV absorbans spektrofotometri yöntemi kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışma kapsamında DNA üzerinde etkisi araştırılan melamin (Sigma, ABD), hazır olarak satın alındı. DNA ise sığır timus dokusundan izole edildi. İzolasyon işlemi için Wizard genomik putrification kit (Promega, USA) kullanıldı ve kit protokolündeki uygulama basamakları sırasıyla takip edildi.
DNA üzerinde etkisi araştırılan melaminin sudaki çözünürlüğünün düşük olması sebebiyle 50 mmol/L olacak şekilde hazırlanan Tris-HCl-NaCl (TBS) [pH:7.4 ve Tris (hidroksil-metil) aminometan (Merck, Almanya), NaCl (Carlo Erba Reagent®, İspanya) ve HCl (Merck, Almanya)] tampon solüsyonu kullanıldı. Melamin çözeltileri, 10 mmol, 5 mmol, 2.5 mmol, 1.25 mmol ve 0.62 mmol konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı ve homojen olana kadar multi rotator (Biosan, Multi RS-60) ile karıştırıldı. Hazırlanan melamin çözeltisi ile DNA, 1:1 oranında eppendorf tüp içerisinde karıştırıldıktan sonra 37°C'de 60 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda DNA-melamin karışımlarının spektral ölçümü için BioTek Epoch-2 spektrofotometeri cihazı kullanıldı ve 230-320 nm dalga boyları arasında değerlendirilmesi yapıldı.

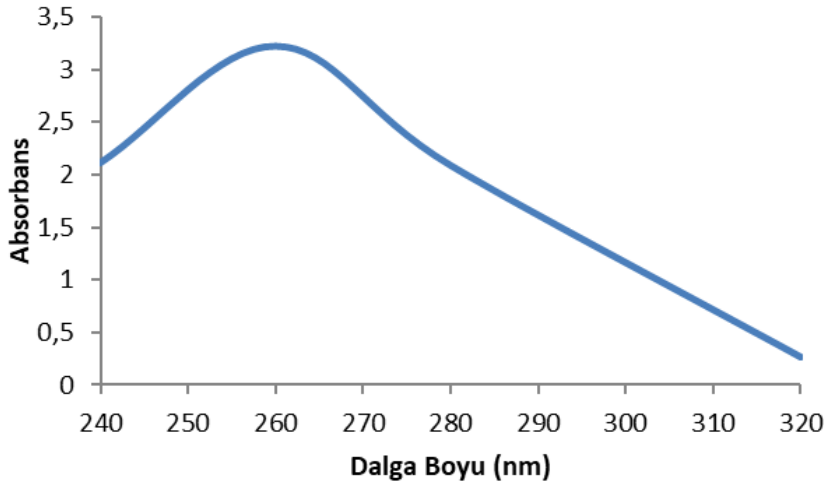
## BULGULAR VE TARTIŞMA

### DNA İzolasyonu

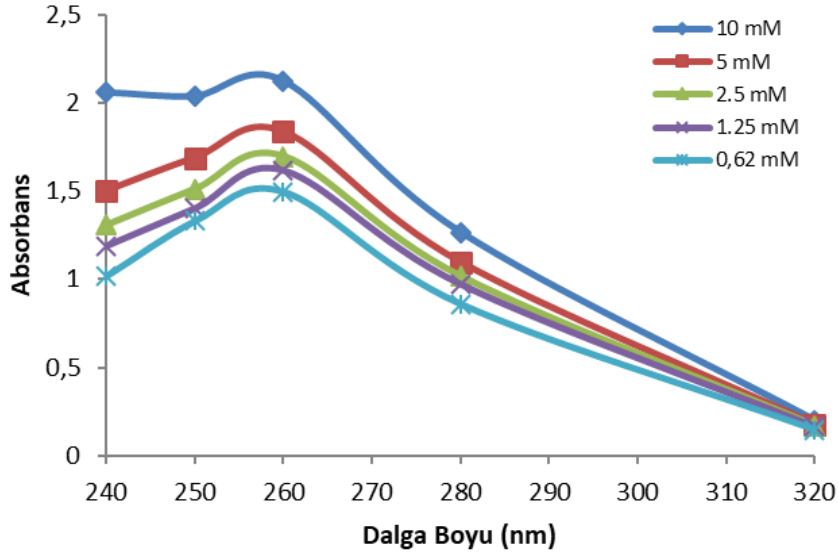
Çalışma kapsamında izole edilen sığır timus DNA'sının saflık ve konsantrasyon ölçümü Thermo Scientific Multiskan GO spektrofotometri cihazı ile yapılmış ve konsantrasyonunun 2800 ng/µl olduğu, 260/280 saflık oranının da 1.80 olduğu belirlenmiştir.

### UV-absorbans Spektrofotometri Yöntemi

Moleküllerin DNA ile olan etkileşiminin incelendiği yöntemlerin başında gelen UV absorbans spektrofotometri yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde beklendiği gibi DNA'ya özgü olan 260 nm dalga piki (Şekil 1) görüldü. Ancak moleküllerin DNA'ya bağlanma şekilleri absorbans dalga pikinde değişikliklere sebep olmaktadır. Bu değişiklik artan şekilde ise hiperkromik, azalan şekilde ise hipokromik olarak adlandırılmaktadır. Genel anlamda absorbsiyon bandında görülen hipokromik ve bathokromik etkinin varlığı moleküller arası etkileşimin interkalasyon olabileceğini işaret ederken, hiperkromik etkinin varlığı ise diğer moleküller arası etkileşimleri ifade etmektedir (Mahadevan and Palaniandavar, 1998; Indumathy ve ark., 2007; Sun ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2010; Huo ve ark., 2012).
Yapmış olduğumuz çalışma kapsamında DNA üzerinde etkisi araştırılan melamin çözeltisinin DNA ile hazırlanan karışımlarının inkübasyonu sonucunda giderek artan konsantrasyonlarda ortaya çıkan hiperkromik etkinin varlığı UV absorbans spektrofotometri ölçümleri ile belirlendi (Şekil 2). Hiperkromik etkinin belirlenmesi, melaminin DNA ile olan etkileşimin interkalasyon yolu ile olmadığını göstermiştir. Sabit tutulan DNA konsantrasyonuna karşı farklı konsantrasyonlarda eklenen melaminin DNA ile etkileşim halinde olduğu ve bu etkileşimin de groove bağlanma şeklinde olabileceği düşünülmektedir.




**Şekil 1:** Sığır timus DNA'sı UV absorbans ölçümü grafiği.




**Şekil 2:** DNA ve Melamin karışımlarının UV absorbans ölçümü grafiği.

Shen ve ark.'nın (2010b) yapmış oldukları bir çalışmada melamin ve DNA arasındaki etkileşim değerlendirilmiş ve bu kapsamda hem normal hem de denatüre edilmiş DNA kullanarak UV absorbans spektrofotometri ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonucunda elde edilen grafiklerin benzerlik göstermesi bileşiklerin DNA ile olan etkileşiminin interkalasyon yolu ile olmadığını doğrulamıştır. Aynı çalışmada melamin ve ilişkili bileşiklerin DNA üzerindeki etkisi viskozimetri ve floresans spektrofotometri gibi yöntemler ile de araştırılmış ve moleküller arası etkileşimin groove bağlanma şeklinde olabileceği belirtilmiştir.

Xie ve ark.'nın yaptığı çalışmada (2015), melamin ve ilişkili bileşiklerin DNA ile olan etkileşimi birçok yöntem ile incelenmiştir. UV absorbans ölçümleri sonunda elde edilen veriler ile oluşturulan grafiklerde sabit DNA konsantrasonuna karşı artan konsantrasyonda melamin ve ilişkili bileşiklerin hazırlanan çözeltileri eklendiğinde hiperkromik etkinin varlığı görülmüştür. Hiperkromik etkinin görülmesi moleküller arası etkileşimin interkalasyon yolu ile olmadığını göstermiş ve diğer yöntemler ile de bu durum desteklenmiştir. Çalışma ekibi tarafından, melamin ve ilişkili bileşiklerin DNA ile etkileşim içinde olduğunu ve bu etkileşimin

de moleküllerin hidrojen bağı ile DNA yapısındaki küçük oluklara tutunmasıyla gerçekleşen groove bağlanma şeklinde olabileceği bildirilmiştir.

## SONUÇ

Melamin konsantrasyonundaki artışa paralel olarak dalga piklerinin yükseldiği gözlendi. Elde edilen bu hiperkromik etkinin, genomik DNA ile melamin molekülleri arasında oluşan bir bağlanmadan ortaya çıktığı ve etkileşimin groove bağlama yoluyla oluşabileceği sonucuna varıldı. Sonuç olarak, tüketilebilir gıda niteliği olmayan ve istem dışı maruz kalınan melaminin, genomik DNA'ya bağlandığı ve yapısal değişikliklere sebep olabileceği düşünüldü.

## TEŞEKKÜR

Araştırmamız Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi KİT-ARGEM Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Yazarlar olarak çalışmanın laboratuvar aşamalarında önemli katkılar sunan Sayın Mert Sudağıdan ve Sayın Prof. Dr. Veli Cengiz Özalp'a destekleri için teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Acar O 2014. Süt ve yoğurtta melaminin biyokristalizasyon yöntemi ile belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü-Yüksek Lisans Tezi.

Dorne JL, Doerge DR, Vandenbroeck M, Fink-Gremmels J, Mennes W, Knutsen HK, Vernazza F, Castle L, Edler L, Benford D 2013. Recent advances in the risk assessment of melamine and cyanuric acid in animal feed. Toxicology and Applied Pharmacology, 270:218-229.

FDA (Food and Drug Administration), 2008. Melamine pet food recall - frequently asked questions. https://www.fda.gov/animal-veterinary/recalls-withdrawals/melamine-pet-food-recall-frequently-asked-questions#humanhealth [Erişim 23.09.2019]

Huo R, Xu G, Jiang X, Ge Y, Xue Z, Cui F 2012. Calf thymus DNA binding studies of the new neodymium-naproxen complex. Journal of Biochemical and Moleculer Toxicology, vol 26, number 5 pp:193-198.

Indumathy R, Radhika S, Kanthimathi M, Weyhermuller T, Nair BU 2007. Cobalt complexes of terpyridine ligand: Crystal structure and photocleavage of DNA. Journal of Inorganic Biochemistry, 101:434-443.

Kumar RS, Arunachalam S 2006. Synthesis, characterization and DNA binding studies of a polymercobalt(III) complex containing the 2,2'-bipyridyl ligand. Polyhedron, *25*, 3113-3117.

Long EC and Barton JK 1990. On demonstrating DNA intercalation. Accounts of Chemical Research, 23, 271-273.

Mahadevan S, Palaniandavar M 1998. Spectroskopic and voltammectric studies on copper complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolines bound to calf thymus DNA. Inorganic Chemistry, 37:693-700.

Paternack RF, Gibbs EJ, Villafranca JJ 1983. Interactions of porphyrins with nucleic acids. Biochemistry, 22, 2406-2414.

Puschner B, Reimschuessel R 2011. Toxicosis caused by melamine and cyanuric acid in dogs and cats: uncovering the mystery and subsequent global implications. Clinics in Laboratory Medicine, 31, 181-199.

Shen HY, Liu YQ, Gao J, Zhen HM, Zhu N, Li J 2010a. In vitro study of DNA interaction with melamine and its related compounds. DNA and Cell Bıology, 255-264, DOI 10.1089/dna.2010.1095.

Shen HY, Zheng HM, Zhu N, Liu YQ, Gao J, Li J 2010b. Electrochemical investigation of DNA interaction with melamine and its related compounds (MARCs). International Journal of Electrochemical Science, 5:1587-1596.

Sun Y, Liu R, Chi Z, Qin P, Fang X, Mou Y 2010. Spectroscospic investigation on the toxic interaction of melamine with herring sperm DNA. Journal of Biochemical and Moleculer Toxicology, 24:323-329. DOI 10:1002/jbt.20341.

Wang Y, Zhou A 2007. Spectroscopic studius on the binding of methylene blue with DNA by means of cyclodextrin supramoleculer systems. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 190, 121-127.

WHO (World Health Organization), 2009. Background paper on the chemistry of melamine alone and in combination with related compounds. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine_2.pdf [Erişim 12.10.2019]

Xie J, Chen D, Wu Q, Wang J, Qiao H 2015. Spectroscopic analyses on interaction of melamine, cyanuric acid and üric acid with DNA. Spectrochimica Acta Part A: Moleculer and Biomoleculer Spectroscopy 149, 714-721.

Zhang GW, Guo JB, Zhao N, Wang JR 2010. Study of interaction between kaempferol-$Eu^{3+}$ complex and DNA with the use of the neutral red dye as a fluorescence probe. Sensors and Actuators B: Chemical, 144:239-521.

Zhao N, Wang X, Pan H, Hu Y, Ding L 2010. Spectroscopic studies on the interaction between tryptophan-erbium(III) complex and herring sperm DNA. Spectrochimica Acta Part A: Moleculer and Biomoleculer Spectroscopy, 75,1435-1442.

# Tahıllı ve Tahılsız Ticari Kuru Köpek Mamaların In vitro Organik Madde Sindirimi ve Bazı Fermentasyon Özelliklerinin Karşılaştırılması

Oğuzhan Kahraman[1*], Fatma İnal[1]

[1]Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları ABD, Konya,Türkiye

Bu çalışma ‘’Farklı İçerikli Ticari Kuru Köpek Mamalarının Klasik ve In vitro Yöntemlerle Sindirilebilirliklerinin ve Kalitelerinin Belirlenmesi‘’ isimli doktora tez çalışmasından uyarlanmış olup Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Koordinatörlüğü tarafından ÖYP-101 proje numarası ile desteklenmiştir.

*Sorumlu yazar e-mail: vetoguzhan90@gmail.com

**Özet**

Bu çalışmada farklı içerikli ticari tahıllı ve tahılsız kuru köpek mamalarının in vitro yöntemle sindirilebilirlik ve diğer parametrelerin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. 14 adet tahıllı (7 adet tavuklu-tahıllı, 7 adet kuzu etli-tahıllı) ve 7 adet tahılsız mama olmak üzere 21 farklı ticari köpek maması taze köpek dışkısı kullanılarak *in vitro* ortamda değerlendirilmiştir.

Çalışmada tahıllı mamaların *in vitro* organik madde sindirilebilirliği daha yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Gruplar arası pH değişimleri önemsizdir ($P>0.05$). Toplam *in vitro* gaz üretimleri tahıllı mamalarda daha yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). Köpek mamalarının kalitelerinin değerlendirilmesinde sindirilebilirlik konusu en önemli parametrelerden biridir. Bu çalışma genel olarak değerlendirildiğinde tahılsız mamaların tahıllı mamalardan daha çok sindirildiği ve köpekler için daha faydalı olduğu söylenemez. Çalışma sonucundan tahıllı mamaların organik madde sindirilebilirliği daha yüksektir. Köpek mamalarına katılan tahıl harici nişasta kaynakları ile ilgili bazı çalışmalar olmasına rağmen ticari tahılsız köpek mamalarının değerlendirilebilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Köpek, *in vitro*, sindirilebilirlik, tahılsız.

## Comparison of *In vitro* Organic Matter Digestibilities and Some Fermentation Properties of Grain and Grain-free Commercial Dry Dog Foods

**Abstract**

In this study, it was aimed to determine and compare the digestibility and other parameters of commercial dog foods with grain and grain-free with different contents with *in vitro* method. 21 different commercial dog foods including 14 with-grain (7 chicken-grain, 7 lamb meat-grain) and 7 grain-free foods were evaluated in *in vitro* conditions using fresh dog feces.

*In vitro* organic matter digestibility of foods with grain were found higher in the study ($P<0.05$). pH changes between groups were insignificant ($P>0.05$). Total *in vitro* gas production was found higher in foods that contain grain ($P<0.05$). Digestibility is one of the most important parameter in evaluating the quality of dog food. When this study is evaluated in general, it can not be said that neither grain-free foods are digested more than foods with grain nor are more beneficial for dogs. From the study results, organic matter digestibility of foods with grain are higher. Although there are some studies on starch sources other than grains participating in dog foods, more studies are needed to evaluate commercial grain-free dog foods.

**Keywords:** Dog, *in vitro*, digestibility, grain-free.

## GİRİŞ

Yetişkin köpeklerde nişasta sindirilebilirliğinin %95'ten fazla olduğu bildirilmiştir (Walker ve ark., 1994, Murray ve ark., 1999), ancak bunun değişebileceği de gösterilmiştir. Nişasta sindirilebilirliğindeki farklılıklar, köpeğin cüssesi, tahıl tipi, nişasta-protein etkileşimleri, nişasta tipi, sindirim inhibitörleri, işleme ve işleme sonrası parçacık boyutu gibi faktörlerden kaynaklanır (Svihus ve ark., 2005, Goudez ve ark., 2011). Kuru pet mamaları ekstruder olarak isimlendirilen yem maddelerindeki nişastanın jelatinizasyonu ile sonuçlanan yöntemle üretilmektedir. Jelatinizasyon nişasta granüllerinin nem, sıcaklık, basınç ve mekaniksel kesme ile tamamının parçalanmasını tanımlamaktadır (Watson 2005, McCleary ve ark., 2006). Tahılsız mamanın kökeninde doğaları gereği köpeklerin tahıl veya nişasta tüketmek için yaratılmadığına dair inanç yatmaktadır. Evcil hayvan sahipleri ve mama üreticileri arasındaki bu ortak anlayış ve uyumluluk sayesinde tahıl içermeyen mamalar hızla yaygınlaşmıştır. Birçok pet sahibi, tahılsız mamanın hayvan sağlığı için en iyisi olduğuna

inanmaktadır. Fakat köpekler tahıl bakımından zengin mama ile beslendiğinde gelişiminin gayet iyi olduğu ortadadır (Beynen 2016).
Köpek mamalarının in vitro sindirilebilirlikleri hakkında dışkı, ileum ve diğer bağırsak bölmelerinden elde edilen inokulumlarla çalışmalar ve enzimatik metodlarla sindirim sistemi organlarının taklit edildiği *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu tez çalışması ile kaliteli mama denilince ilk düşünülmesi gereken sindirilebilirlik konusunda tahılsız mamaların tahıllı mamalar kadar sindirilebilir olup olmadığı araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Besin Madde Analizleri:** 14 adet tahıllı (7 adet tavuklu-tahıllı, 7 adet kuzu etli-tahıllı) ve 7 adet tahılsız mama olmak üzere 21 farklı ticari köpek mamasına kuru madde(KM), ham kül(HK), ham yağ(HY), ham selüloz(HS) ve ham protein(HP) analizleri (Akkılıç ve Sürmen, 1979) yapıldı. Ayrıca mamaların polarimetrik metod (AOAC, 2003) ile nişasta içerikleri belirlendi.

***In vitro* Toplam Gaz Üretimi, pH ve Organik Madde Sindirilebilirliklerinin Belirlenmesi:** Sunvold ve ark., (1995b)'nın metoduna göre hazırlanan medyum solüsyonu ve taze dışkı inokulumu ile *in vitro* denemeler yürütülmüştür. Öğütülen köpek mamalarından 310 mg numune pyrex şişelerine tartıldı ve üzerine 30 ml medyum solüsyonu ve 1 ml inokulum ilave edildikten sonra 39°C'de 6., 12., 24. ve 48. saatlerdeki fermentasyon parametrelerini belirlemek üzere inkübasyona bırakıldı. *In vitro* organik madde sindirilebilirliğinin (IVOMS) belirlenmesi için aşağıdaki eşitlik(1) kullanılmıştır:

$$IVOMD = 1 - [(OM\ kalıntısı - OMkör) / başlangıçtaki\ OM)] \times 100 \qquad (1)$$

6., 12., 24. ve 48. fermentasyon saatlerindeki IVOMS, pH ve toplam gaz üretimleri belirlenmiştir.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Elde edilen verilerde tahıllı-tavuk etli, tahıllı-kuzu etli ve tahılsız olmak üzere 3 grup; tahıllı ve tahılsız olmak üzere 2 grup şeklinde istatistik analizler yapıldı. Tahılsız mamalarda hayvansal protein kaynağı çok değişken olduğu için (kuzu eti, tavuk eti, balık unu, geyik eti vb.), hayvansal protein kaynağına göre alt gruplara ayrılmadı.
Verilerin değerlendirilmesinde SPPS V.22 (IBM Corp., IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanıldı. Tekrarlanan ölçümlerin homojenliği, Mauchly's Küresellik Testi ile değerlendirildi. Ortalamaların karşılaştırmaları için, faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümler varyans analizi kullanıldı ve GLM testi uygulandı. Parametrik testlerin, faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümler varyans analizi önşartlarını sağlamadığı durumlarda, Sphericity Assumed yerine, Greenhouse-Geisser önemlilik değeri kabul edildi. Üç grubun çoklu karşılaştırmaları ise Düzeltilmiş Bonferroni Testi ile gerçekleştirildi. Değişkenler normallik, varyansların homojenliği ön şartlarının kontrolü yapıldıktan sonra (Shapiro Wilk ve Levene Testi) değerlendirildi. Veri analizi yapılırken, iki grup karşılaştırması için Bağımsız 2 grup t testi (Student's t test), önşartlar sağlanmadığında ise Mann Whitney-U testi, üç ve daha fazla grup karşılaştırması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi, önşartlar sağlanmadığında ise Kruskal Wallis ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni-Dunn testi kullanıldı.

## BULGULAR

**Tablo 1.** Kullanılan mamaların besin madde kompozisyonu ve Atwater faktörle belirlenen metabolik enerji (ME, kcal/kg KM) düzeyleri (%KM'de).

| Grup | Mama no | KM | HK | HY | HS | HP | Nişasta | ME |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tahıllı-tavuk etli | 1 | 93,54 | 7,34 | 10,86 | 5,28 | 29,93 | 42,73 | 3608,3 |
| | 2 | 95,5 | 7,77 | 11,69 | 4,57 | 28,77 | 37,07 | 3659,79 |
| | 3 | 94,64 | 10,96 | 8,83 | 4,99 | 28,74 | 31,37 | 3376,64 |
| | 4 | 94,52 | 5,39 | 13,45 | 5,23 | 24,5 | 44,77 | 3818,24 |
| | 5 | 92,42 | 6,68 | 15,67 | 3,85 | 34,13 | 33,86 | 3948,98 |
| | 6 | 94,37 | 9,67 | 9,92 | 7,42 | 38,13 | 23,38 | 3391,76 |
| | 7 | 94,41 | 6,3 | 9,09 | 5,82 | 28,49 | 43,9 | 3532,09 |
| Tahıllı-kuzu etli | 1 | 93,5 | 6,18 | 9,58 | 5,07 | 30,66 | 42,9 | 3591,18 |
| | 2 | 95,22 | 8,94 | 11,84 | 5,05 | 28,59 | 34,4 | 3607,49 |
| | 3 | 95,8 | 6,91 | 10,27 | 4,35 | 21,27 | 42,52 | 3624,63 |
| | 4 | 93,1 | 9,63 | 10,48 | 5,9 | 29,25 | 36,24 | 3479 |
| | 5 | 95,93 | 8,33 | 16,68 | 4,46 | 28,4 | 29,05 | 3902,74 |
| | 6 | 95,01 | 7,08 | 7,22 | 11,81 | 25,33 | 50,75 | 3184,09 |
| | 7 | 94,88 | 6,68 | 11,86 | 6,29 | 30,99 | 38,09 | 3646,55 |
| Tahılsız | 1 | 94,37 | 7,5 | 13,98 | 6,35 | 27,64 | 45,83 | 3727,03 |
| | 2 | 95,54 | 9,51 | 16,41 | 3,1 | 41,4 | 20,6 | 3896,85 |
| | 3 | 92,87 | 8,42 | 11,27 | 3,37 | 36,05 | 31,32 | 3662,43 |
| | 4 | 94,67 | 9,63 | 15,59 | 4,61 | 45,27 | 20,07 | 3796,93 |
| | 5 | 94,7 | 9,37 | 15,68 | 3,79 | 43,48 | 19,63 | 3841,5 |
| | 6 | 94,53 | 6,79 | 12,55 | 3,1 | 28,19 | 37,47 | 3797,63 |
| | 7 | 96,01 | 7,04 | 13,08 | 4,51 | 36,96 | 27,72 | 3695,24 |

**Tablo 2**. Mamaların 6., 12., 24. ve 48. saatlerdeki IVOMS değerleri (%KM'de)

| | | 6. saat | 12. saat | 24. saat | 48. saat | Total | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tahıllı | n | 14 | 14 | 14 | 14 | 56 | **0,039** |
| | $\bar{x}$ | 52,73 | 62,8 | 74,69 | 75,88 | 66,53 | |
| | SEM | 1,91 | 1,88 | 2,34 | 2,49 | 1,66 | |
| Tahılsız | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 28 | |
| | $\bar{x}$ | 55,68 | 63,93 | 70,77 | 72,07 | 65,61 | |
| | SEM | 2,82 | 3,71 | 3,63 | 3,45 | 2,04 | |
| Total | n | 21 | 21 | 21 | 21 | | |
| | $\bar{x}$ | $53,71^{c}$ | $63,17^{b}$ | $73,39^{a}$ | $74,61^{a}$ | | |
| | SEM | 1,57 | 1,71 | 1,96 | 2,01 | | |
| | p | **0,000** | | | | | |

**Tablo 3**. Mamaların 6., 12., 24. ve 48. saatlerdeki pH değerleri

| | | 6.saat | 12.saat | 24.saat | 48.saat | Total | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tahıllı-tavuk etli | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 28 | 0,362 |
| | $\bar{x}$ | 6,35 | 6,27 | 6,35 | 6,41 | 6,35 | |
| | SEM | 0,09 | 0,07 | 0,04 | 0,07 | 0,03 | |
| Tahıllı-kuzu etli | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 28 | |
| | $\bar{x}$ | 6,32 | 6,23 | 6,23 | 6,26 | 6,26 | |
| | SEM | 0,09 | 0,04 | 0,03 | 0,12 | 0,04 | |
| Tahılsız | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 28 | |
| | $\bar{x}$ | 6,54 | 6,45 | 6,42 | 6,38 | 6,45 | |
| | SEM | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0,06 | 0,02 | |
| Total | n | 21 | 21 | 21 | 21 | | |
| | $\bar{x}$ | 6,4 | 6,32 | 6,33 | 6,35 | | |
| | SEM | 0,05 | 0,04 | 0,03 | 0,05 | | |
| | p | 0,598 | | | | | |

**Tablo 4**. Grupların 6., 12., 24. ve 48. *in vitro* inkübasyon saatlerindeki toplam gaz üretimleri, ml/310mg.

| | | 6.saat | 12.saat | 24.saat | 48.saat | Total | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tahıllı | n | 14 | 14 | 14 | 14 | 56 | **0,031** |
| | $\bar{x}$ | 21,1 | 36,19 | 48,53 | 57,35 | 40,82 | |
| | SEM | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,03 | |
| Tahılsız | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 28 | |
| | $\bar{x}$ | 18,1 | 32,37 | 41,76 | 47,27 | 34,88 | |
| | SEM | 0,28 | 0,36 | 0,44 | 0,56 | 0,39 | |
| Total | n | 21 | 21 | 21 | 21 | | |
| | $\bar{x}$ | $20,10^{d}$ | $34,92^{c}$ | $46,24^{b}$ | $54,01^{a}$ | | |
| | SEM | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | | |
| | p | **0,000** | | | | | |

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Mamalar tahıllı ve tahılsız olarak değerlendirildiğinde (IVOMS) farklılığı önemli çıkmıştır. 6., 12., 24. ve 48. saatler arasındaki artış da istatistiksel anlamda önemlidir. Bunun sebebi tahılların bakteriyel fermentasyonunun yüksek olması ve mama üretiminde ısıl işlem uygulandığı için içeriğindeki tahıl nişastasının daha da sindirilebilir hale gelmesidir. Köpek mamalarında *in vitro* sindirilebilirlik çalışmaları nadirdir. Mevcut çalışmalarda da mamalarda kullanılan ham maddelerin sindirilebilirliği incelenmiş ve köpek maması formülasyonlarına katılmalarının faydalı olup olmadığı tartışılmıştır (Bednar ve ark., 2001, Murray ve ark., 2001, Kara ve ark., 2019). Tahılsız mamaların tahıllı mamalara göre daha çok sindirildiğini kanıtlayan bilimsel çalışma yoktur. Tahıllı mamaların ekstrüzyon işlemi ile hazırlanmasından dolayı nişasta jelatinizasyonu ile köpeklerin yüksek oranda sindirmesi sağlanmaktadır. Tahılsız mamalarda da tahıllı mamalara benzer şekilde hazırlandığı için yüksek sindirilebilirlik sağlanmaktadır.

Veriler inkübasyon saatlerine göre kıyaslandığında inkübasyon süresi arttıkça IVOMS önemli ve düzenli bir şekilde artmıştır. Köpeklerde kalın bağırsaktan içeriğin geçişi yaklaşık olarak 12 saat olarak bildirilmektedir (Maskell ve Johnson, 1993). Bununla birlikte bu çalışmada ilerleyen saatlerde sindirilebilirlikler artmış, 24 saat ile 48. saatte en yüksek sindirilebilirlikler elde edilmiştir. Ancak 24. ve 48. saat değerleri birbirine yakındır. Bu durum köpeklerde 24. saatten sonra sindirilebilirliğin yavaş ilerlediği veya durakladığını göstermektedir. Buna rağmen köpeklerde genel olarak *in vitro* çalışmalar 48. saate kadar değerlendirilmektedir (Sunvold ve ark., 1995b, Bosch ve ark., 2008).

Bu çalışmada dışkıdan elde edilen inokulum ilave edilen mamalara 6., 12., 24. ve 48. saatlerde pH ölçümü yapılmıştır. *In vitro* 6., 12., 24. ve 48. saat inkübasyon saatlerinde tahıllı-tavuk etli, tahıllı-kuzu etli ve tahılsız mamalarda belirlenen pH değerleri arasında farklılık bulunmamıştır. İnkübasyon saatleri arasında da belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Cutrignelli ve ark., (2009) farklı karbonhidrat kaynaklarını köpek dışkısı kullanarak *in vitro* ortamda değerlendirmiş ve 48. inkübasyon saatinde pH değerlendirmesinde en düşük pH'yı mısırda belirlemişlerdir. Bunu sırası ile pirinç, buğday ve patates izlemiştir. Bu tez çalışmasında tahılsız mamaların ortalama nişasta içerikleri daha yüksek olduğu halde gruplardaki pH değişimleri arasında farklılık önemsizdir.

Tahıllı ve tahılsız mamalar değerlendirildiğinde ise, tahıllı grupta daha yüksek gaz üretimi görülmektedir. Sindirilebilirliği yüksek mamalarda gaz üretiminin yüksek olması beklenmektedir. Kara ve ark.,(2019) bu çalışmadakine benzer şekilde köpek dışkısı kullanarak yürüttükleri *in vitro* çalışmada, tahıl unlarında 6. saatten itibaren artan düzeyde gaz artışı belirlemişler, patates ununda ise 6. saatte gaz üretimi tespit etmemişlerdir. Bu çalışmada da tahılsız mamaların 6. saat *in vitro* inkübasyon saatindeki gaz üretimleri tahıllı mamalara göre daha düşük kalmıştır. Köpek dışkı inokulumu kullanılarak yürütülen bir başka *in vitro* çalışmada çeşitli lif kaynakları değerlendirilmiş ve bezelye kabuğu, şeker kamışı lifi ve karboksimetilselülozda en düşük gaz üretimi gerçekleştiği rapor edilmiştir(Calabro ve ark., 2013). Bosch ve ark., (2008) ise farklı lif kaynakları arasında bezelye kabuğunun en yüksek, buğday lifinin en düşük gaz üretimi gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Tahılsız mamalar popüler hale gelmeye başlamıştır. Fakat sindirileblirlikleri hakkındaki bilimsel veri kısıtlıdır. Bu tez çalışması bu konuda yapılan ilk çalışmalardan biridir. Tahılsız mamaların doğru bir şekilde değerlendirilmesi için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma ''Farklı İçerikli Ticari Kuru Köpek Mamalarının Klasik ve In vitro Yöntemlerle Sindirilebilirliklerinin ve Kalitelerinin Belirlenmesi'' isimli doktora tez çalışmasından uyarlanmış olup ÖYP-101 proje numarası ile desteklenmiştir. Mali destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Akkılıç M, Sürmen S 1979. Yem Maddeleri ve Hayvan Besleme Laboratuvar Kitabı. Ankara Universitesi Basımevi. Ankara.

AOAC 2003. Official Methods of the AOAC, Ed: Gaithersburg MD, 7th ed. The Association of Official Analytical Chemists.

Bednar GE, Platil AR, Murray SM, Grieshop CM, Merchen NR, Fahey GC 2001. Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. Journal of Nutrition, 131: 276-286.

Beynen AC 2016. Starch in dog foods. Creature Companion, 9(8): 52-53.

Bosch G, Pellikaan WF, Rutten PG, van der Poel AF, Verstegen MW, Hendriks WH 2008. Comparative in vitro fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fibre sources. Journal of Animal Science, 86: 2979-2989.

Calabro S, Carciofi AC, Musco N, Tudisco R, Gomes MOS, Cutrignelli MI 2013. Fermentation characteristics of several carbonhydrate sources for dog diets using the in vitro gas production technique. Italian Journal of Animal Science, 12: 21-27.

Cutrignelli MI, Bovera F, Tudisco R, D'urso S, Marono S, Piccolo G, Calabrò S 2009. In vitro fermentation characteristics of different carbohydrate sources in two dog breeds (German shepherd and Neapolitan mastiff). Journal of animal physiology and animal nutrition, 93(3): 305-312.

Goudez R, Weber M, BiourgeV, Nguyen P 2011. Influence of different levels and sources of resistant starch on faecal quality of dogs of various body sizes. British Journal of Nutrition, 106: 211-215.

Kara K, Guclu BK, Baytok E 2019. Comparison of fermentative digestion levels of processed different starch sources by Labrador Retrievers at different ages. Veterinarni Medicina, 64: 158-171.

Maskell IE, Johnson JV 1993. Digestion and absorption. In: The Waltham Book of Companion Animal Nutrition. Ed:Burger LH, Oxford, Pergamon Press, pp. 25-44.

McCleary BV, Charnock SJ, Rossiter PC, O'Shea MF, Power AM, Lloyd RM 2006. Measurement of carbohydrates in grain, feed and food. Journal of Science of Food and Agriculture, 86: 1648-1661.

Murray SM, Fahey GC, Merchen NR, Sunvold GD, Reinhart GA 1999. Evaluation of selected high-starch flours as ingredients in canine diets. Journal of Animal Science, 77: 2180-2186.

Murray SM, Flickinger EA, Patil AR, Merchen NR, Brent JL Jr, Fahey GC Jr 2001. In vitro fermentation characteristics of native and processed cereal grains and potato starch using ileal chyme from dogs. Journal of Animal Science, 79: 435-444.

Sunvold GD, Fahey GC jr, Merchen NR, Titgemeyer EC, Bourquin LD, Bauer LL, Reinhart GA 1995b. Dietary fibre for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fibre sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber-supplemented diets. Journal of Animal Science, 73: 1099-1109.

Svihus B, Uhlen AK, Harstad OM 2005. Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: a review. Animal Feed Science and Technology, 122: 303-320.

Walker JA, Harmon DL, Gross KL, Collings GF 1994. Evaluation of nutrient utilization in the canine using the ileal cannulation technique. Journal of Nutrition, 124: 2672-2676.

Watson H 2005. Cereals in pet foods, Dogs in Canada Magazine, November. Avaible at: http://www.hilarywatson.com/cereals.pdf [29.06.19]

# Association between single nucleotide polymorphisms of vitamin d receptor gene and diabetes with progression of benign prostatic hyperplasia

Rawaa AlChalabi1*, Mohammed Hussien2* , Dhafar N. Al-Uqaili 3* and Hayder AlAmery4**

*Al-Nahrain University /College of Biotechnology
** Al-Yarmouk Teaching Hospital /Urology Unit

Corresponding Author E-mail: RawaaAlChalabi_1984@yahoo.com

**Abstract**
Benign overgrowth of prostatic tissue represents the most frequent urological diseases in aging men. Vitamin D plays an important role in the regulation of the growth and differentiation of diverse cell types through the cell's specific receptor. The interaction of vitamin-D with VDR is thought to affect the development of BPH. This study was designed to reveal insight into the impacts of the correlation between vitamin D receptor gene polymorphism and diabetes with the expansion of BPH in Iraqi men. Four SNPs in the VDR gene were genotyped for 174 BPH patients and 171 healthy controls. Results reported that the danger of BPH increased with age. Biochemical tests gave a high serum level of PSA, RBS, and HbA1c with mean level (11.14 mg/dl, 247.2 mg/dl, and 8.6%) respectively in patients when compared with the healthy group. Patients expressed a low mean serum level of Vitamin D (7.67ng/ml) while the mean serum level of healthy individuals (34.97ng/ml). Hyperglycemia and vitamin D deficiency are strongly associated parameters that led to an increase of the prostate volume and excess a risk of the BPH progression. Diabetes and some SNPs in the VDR gene such as rs3782905 (Intron4, C/G),rs1544410 (Intron 10, G/A) rs7975232 (Intron 10, A/C) and rs731236 (Exon 11, T/C) were analyzed, the SNPs in non-coding region reflected the significant association with decreasing vitamin D level while rs731236 located in coding region provides non-remarkable effect. Diabetes and SNPs in the non-coding region considered potential markers to maximize the risk of BPH in the Iraqi population. Thus, they may be used in the future as a therapeutic goal in patients with BPH.

**Key words:** Vitamin D Receptor, Polymorphism, Diabetes, BPH.

## Introduction

The prostate is the conductive gland in the male reproductive system, which is located in the pelvic region between the bladder and urethra (Das and Buchholz, 2019). It has various functions such as secretory function, contractile function, and site of the hormone metabolism (Walsh *et al.*,2012; Nickel *et al.*,2018). Age, smoking, chemical exposure, inherited several gene changes, urinary tracts infections, sexually transmitted inflammation are important factors that might affect a man's risk of getting prostate diseases (Shah *et al.*,2018 and AlChalabi *et al.*, 2019).BPH is a not malignant increase in the volume of the prostate gland. Signs may include frequent urination, inability to urinate or loss of bladder control. The obesity, type 2 diabetes, and erectile dysfunction are the main risk laborers of BPH (Burke *et al.*,2006; Chen *et al.*,2009 and Cai *et al.*, 2019). Diabetes is a state that reduces the body's ability to process blood glucose, which leads to various complications in many parts of the body, including the urinary tracts which make them more sensitive to infections (Aruna *et al.*, 2012;Benjamin, 2014 and Hong *et al.*, 2019). Diabetes has a vital role in the progression of BPH, which causes many chronic conditions and damages the blood vessels that affect different organs potentially the prostate. Hyperglycemia and poorly managed diabetes cause frequent UTIs, irritate the prostate area and enable the bacteria to enter the prostate and cause prostatitis (Irwin *et al.*, 2011 and Barua. *et al.*, 2019).

Vitamin D composed in the skin in response to UV light exposure, or it obtained from dietary sources (Bordelon *et al.*,2009). The serious task of vitamin D is to preserve natural levels of calcium and phosphorus to maintain strong bones. Suitable levels of vitamin D reduce an individual's risk of developing osteoporosis, hypertension, and cancer. Vitamin D boosts the strength of an immune system, aids the conservation of joint and muscle comfort, healthy mood, and supports health of most organs (Adorini *et al.*, 2007; Hendrickson *et al.*,2011). Vitamin D deficiency is epidemic among both children and adults, especially in elderly people in most of the countries (Orwoll *et al.*, 2009). The functional form of vitamin D 1, 25-dihydroxy vitamin D inhibits cancer cell growth, angiogenesis, and metastasis. Vitamin D3 and testosterone described as vigorous regulators for growth and differentiation of isolated prostate epithelial cells from patients with BPH (Crescioli *et al.*, 2000; Parmeet *et al.*, 2011). The action of these parameters is mediated by their respective

receptors: androgen receptor (AR) and VDR. (Hammarsten *et al.*, 2006; Zhang and Shan, 2013). The human VDR gene is found on chromosome 12q13.11 and is made up of 12 exons which have more than 11 single nucleotide polymorphisms (SNPs) that have been reported by the genome-wide scans (Hamasakia *et al.*,2002; Giovannucci,2008 and Li *et al.*,2015 ). Some reported polymorphisms of the VDR gene have an effect on the development of various prostate diseases (Xu *et al.*, 2014).

## Materials and Methods:

- Blood Samples: all blood samples (total 5 ml) were collected by venipuncture from a peripheral vein by using 5 ml plastic disposable syringes into plain tubes for serum isolation and EDTA tubes for DNA extraction.
- Estimation serum level of Prostate Specific Antigen (PSA).The assay principle take in a two-step enzyme immunoassay sandwich procedure with Enzyme-Linked Fluorescence Assay (ELFA) (BioMerieux /France).
- Estimation serum level of vitamin D had done by using Cobas E411 Analyzer from Roche Company. One milliliter of the serum from each patient and healthy individual transferred into tubes, then loaded on the analyzer.
- HbA1c is a clinically helpful indicator of mean glycemia before 120 days (the normal life expectancy of erythrocytes). HbA1c was measured by the fluorescence immunoassay technique.
- Random blood sugar (RBS): serum level of glucose was measured by Trinder and Barham Method.
- DNA Extraction: the frozen blood specimens, which stored in EDTA tubes were thawed thoroughly and prepared for extraction by using the Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Korea) Moreover, the extracted DNA was approved via the gel electrophoresis on 2% agarose, bands were visualized in the UV cabinet (Molecular Imager® 2000 Bio-Rad, USA). The extracted samples were stocked at 4 °C.
- PCR Preparation: to amplify the target gene, PCR used specific primers. The primers of VDR were designed based on the human VDR sequence. Three sets of primers (P1, P2, and P3) were designed by using the VDR reference gene sequence via employing the Primer-BLAST tool in the NCBI website (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Primer sets (P1 and P2) determine the area surrounding the location of rs3782905 and rs1544410 SNPs respectively on the VDR gene while the P3 primer set covers a wider area of VDR gene where rs731236 and rs7975232 located. Primers sets explained in table 1.

**Table 1: Oligonucleotide sequences for PCR and SNPs locations.**

| Primer Sets | Primers (5' to 3') | Coverage area on VDR gene (bp) | SNPs | SNP Location | Intron / Exon | PL (bp) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | F- CATGCTAGGCACCCAGAGAG<br>R-TAGCAGAAAGAGGCAGTGGG | 32541 - 32680 | rs3782905 | 32648 | Intron 4 | 140 |
| **P2** | F- CACAGCCTGGAGCTGATTGA<br>R- CGGAAGAGGTCAAGGGTCAC | 58586 - 59150 | rs1544410 | 58980 | Intron10 | 565 |
| **P3** | F- ACAGATGTGAAGGCTGGTGG<br>R-GAATGGGCTGGGTGGATAGG | 59708 - 60434 | rs731236 | 60058 | Exon11 | 727 |
| | | | rs7975232 | 59978 | Intron10 | |

**(Note: PL= Product Length, bp= base pair)**

- Three sets of primers had been provided by Macrogen Inc. (Korea). The PCR carried out with each set of primers on all samples in a 25 µl reaction magnitude. Each reaction consisted of 12.5µl of GoTaq®Green Master Mix (Promega, USA), (1/10) *P*mole/ µl of forward and reverse primer, 8.5µl of DDH2O and 3µl of DNA template. Cycling parameters were set separately for each primer set relying on the melting temperature (Tm) of the primers and longitude of products. The PCR approach for all as followed: denatured at 95 °C for 5 min, then the cycling was started at 95 °C for 1 min followed by 60 °C for 1 min and extended at 72 °C for 1 min. The cycle number was 40 cycles, followed by a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR reactions had done by TC-5000 PCR Thermal Cycler (GMI, USA). The PCR products detected by gel electrophoresis and using the molecular ladder 100bp

(Promega, USA) as a molecular weight marker then product bands were visualized under UV illumination (Molecular Imager® 2000 Bio-Rad, USA).

- **DNA Sequencing**: in order to study the selected SNPs in the VDR gene. DNA sequencing carried out for PCR products of all samples by using the Dye Terminator Removal kit (Thermo Scientific, 2007). The reaction performed via the 48-capillary 3730 Genetic Analyzer Applied Biosystems by Macrogen Inc. (Korea). The nucleotide sequences were cleaned and analyzed by using Bioedit Software (version 7.0.5.3).

**Results and Discussion**

Three hundred and forty-five Iraqi subjects had been impersonated into this study and separate into two groups. A first group included 174 (51%) BPH patients and the second gathering comprised of 171 (49%) healthy men. Results confirmed that the risk of BPH expanded with age. The average age of patients was (69.6) years, extending between (49-90) years and the mean age of healthy individuals was (62.2) years. Results in Table 2 demonstrated the classification of patients and healthy men according to age group. A mass ≥ 70 years had the greatest occurrence (45.977%) of BPH patients. Pursued by age gathering (61-70) with (43.103 %) and (8.046%) of age gathering (51-60) while just 2.874% of the patients were recorded in the age gathering (40-50) year.

Table-2- BPH patients and healthy men according to age groups

| Age group | BPH Patients | | Healthy Individuals | |
|---|---|---|---|---|
| | No. | % | No. | % |
| 40-50 | 5 | .2874 | 19 | 11.111 |
| 51-60 | 14 | .8046 | 31 | 18.128 |
| 61-70 | 75 | 43.103 | 70 | 40.936 |
| >70 | 80 | 45.977 | 51 | 29.825 |
| Total | 174 | 100 | 171 | 100 |

The laboratory tests for estimation serum levels of PSA, RBS, HbA1c and vitamin D are very important parameters to diagnose and treat BPH. Results in Table 3 demonstrated that serum level of PSA of analyzed BPH patients was range (**7.6-27.4** m**g**/ml) with a mean level estimate of 11.14 mg/ml while the PSA levels for healthy men were extending (**3.8-8.4** mg/ml) and the mean was 4.74 mg/ml. The measurable examination of results guaranteed a high noteworthy contrast ($P<0.01$) in the mean serum grouping of PSA between BPH patients and healthy people. The results reported the increased serum levels of RBS and Hb1C in patients with mean level 247.2 mg/dl, 8.6% respectively with a significant difference when compared with the healthy. Several studies showed that sugar level in serum measured rapidly was significantly higher in men with BPH than healthy, sugar level proportionally correlated with the progression rate of BPH.

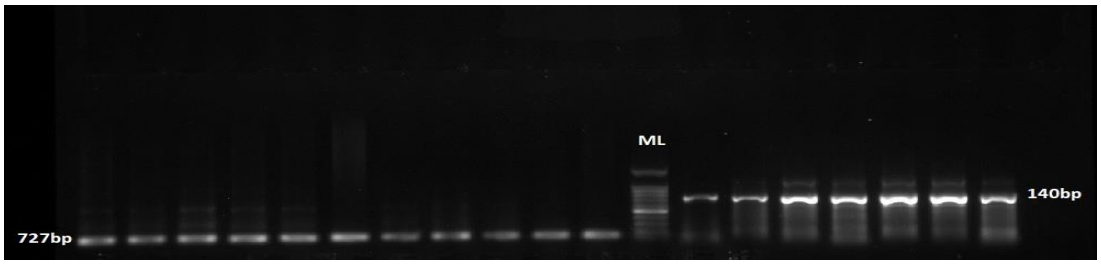
Table -3- Serum levels of PSA, RBS and Hb1C and Vitamin D among groups.

| Parameters / Group | PSA(mg/dl) | | RBS(mg/ml) | | Hb1C(%) | | Vit.D(ng/ml) | | Sig.between groups | P-Value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mean ± SD | Min-Mix | Mean ± SD | Min-Mix | Mean ± SD | Min-Mix | Mean ± SD | Min-Mix | | |
| BPH patients | **11.14±5.31** | **7.6-27.4** | **247.2 ±76.88** | **175-450** | **8.6±1.69** | **6.9-12** | **7.67±11.15** | **6.30-32.64** | ** | **0.0001** |
| Healthy | **4.47±1.63** | **3.8-8.4** | **146.2±37.92** | **96-201** | **5.2±1.66** | **3.2-7.1** | **34.97±6.13** | **25.43-61.2** | ** | **0.0001** |

The detection of SNPs carried out by the sequencing technique. Genotype and allele frequencies of VDR SNPs (rs3782905, rs1544410, rs7975232, and rs731236) for all 345 subjects were shown in Table4. The statistical conclusion of the results exposed a significant difference in allelic frequencies of the rs1544410 genotype. 27 Patients had homozygote wildtype AA while G/A (G>A was found in 147 patients, 102 out of them had heterozygote allele (GA) and 45 persons had homozygote allele (GG). Significant differences in the genotype and allele frequencies of the VDR (rs3782905) polymorphisms between BPH patients and healthy men. The rs3782905 C allele was associated with a worthy increase of BPH risk when compared with the G allele. The rs3782905 CC homozygote genotype (45.4%) was strongly associated with BPH danger in comparison with GG homozygote (19.5%) and GC heterozygote (35.1%). In this study, a positive association between BPH and VDR gene variants was revealed. Based on these results, a direct effect of VDR polymorphisms on the prostate size and function can be supposed. The determination of the individual genetic background can be remarkable

in the determination of prostate pathology. At the same time, the rs7975232 C allele was associated with an expressive increase of BPH riskiness as compared with the A allele. The rs7975232 CC (42%) and AA (1.2%) / CA (44.8%) homo and hetero genotypes were correlated with the development of BPH risk when compared with the wild-type. For rs731236, the ratio of CC (9.8%)/CT (12.6%) genotypes are lower than TT (77.6%) in the subjects with BPH the difference is statistically significant.

Results of PCR reaction by using primers (P1 & P3)




Results of PCR reaction by using primers (P2)

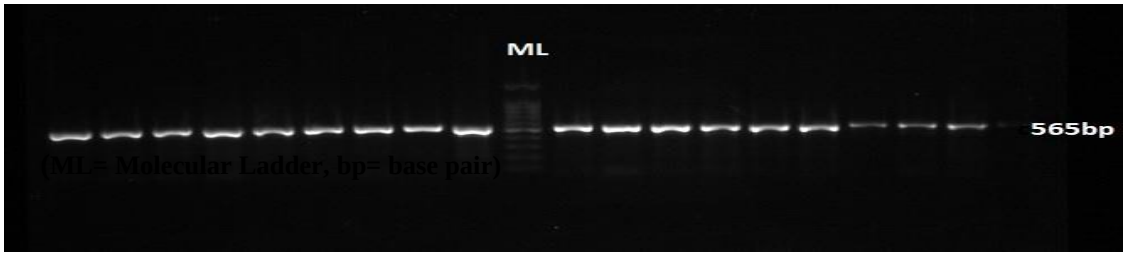



Table **4: Allele frequencies for some SNPs of VDR gene in BPH patients and healthy individuals .**

| SNP of VDR gene | BPH Patients (N: 174, %) | Healthy (N:171,%) | **Variations Total Number / SNP (%) in Patients** |
|---|---|---|---|
| rs3782905<br><br>CC<br>GG<br>GC<br>G<br>C | <br><br>79 (45.4)<br>34 (19.5)<br>61 (35.1)<br>129 (37.1)<br>219 (62.9) | <br><br>108 (63.2)<br>17 (9.9)<br>46 (26.9)<br>80 (23.4)<br>262 (76.6) | Wild type=79<br>SNP=95 |
| rs1544410<br>AA<br>GG<br>GA<br>A<br>G | <br>27 (15.5)<br>45 (25.9)<br>102 (58.6)<br>156 (44.8)<br>192 (55.2) | <br>96 (56.1)<br>11 (6.4)<br>64 (37.5)<br>256 (74.9)<br>86 (25.1) | Wild type=27<br>SNP=147 |
| rs7975232<br>CC<br>AA<br>CA<br>C<br>A | <br>73 (42)<br>23 (13.2)<br>78 (44.8)<br>224 (64.4)<br>124 (35.6) | <br>118 (69)<br>9 (5.3)<br>44 (25.7)<br>280 (81.9)<br>62 (18.1) | Wild type=73<br>SNP=101 |
| rs731236<br>TT<br>CC<br>TC<br>T<br>C | <br>135 (77.6)<br>17 (9.8)<br>22 (12.6)<br>212 (83.9<br>136 (16.1) | <br>151 (88.3)<br>8 (4.7)<br>12 (7)<br>314 (91.8)<br>28 (8.2) | Wild type=135<br>SNP= 39 |

## Discussion

This result agreed with Madersbachera *et al*., (2019) they reported 50% of men >50 years of age to have BPH, increasing to >80% in their eighth decade of life and older. The incidence and prevalence of BPH have rapidly increased with negatively influences the quality of life and results in considerable medical intervention and expense (Ajayiac and Abrahamab, 2018).Men with type II diabetes have more severe BPH and lower urine flow rates compared to non-diabetic men, which is true of metabolic syndromes with underlying insulin resistance (Hong *et al*., 2019).

Joseph *et al* .,(2003) reported that men with a history of hypertension and diabetes had a 1.5-fold higher risk of moderate-to-severe BPH when compared with individuals without a history of these diseases. Diabetes may directly affect the growth of the prostate gland through enhancing IGF-1 receptor signaling. Because of its structural similarity to IGF, insulin can bind to the IGF receptor and activate the IGF signaling pathway to promote prostatic growth (Kopp, 2018). Also, results demonstrated decreasing serum level of vitamin D. The mean serum level of vitamin D in patients with BPH is (7.67 ng/ml) which significantly lower than the mean serum level of vitamin D of healthy men (34.97 ng/ml). Zhang *et al.*, (2016) reported that the group with vitamin D deficiency had a significantly higher prostate volume, PSA value, and lower urination vs the control group. Vitamin D receptors are detected in bladder and prostate which has a role in the endocrine and autocrine Vitamin D metabolism pathways. Data from an Egyptian survey showed that the low serum level of Vitamin D was highly prevalent among adult men in Egypt and Vitamin D deficiency was associated with moderate-severe BPH (Elshazly *et al.*, 2017). Low level of Vitamin D modulates cell proliferation with differentiation of normal tissue, regulates apoptosis, cell adhesion at the tumor cell level. It also modifies tumor angiogenesis, invasion, and metastasis (Bai *et al*.,2009 and Han *et al*., 2016).

Vikrant *et al*., (2017), reported that BsmI (A/G) polymorphism (rs544410) of the VDR gene is an important genetic variation that altered the level and metabolism of vitamin D which play a vital function in the various biological processes. The results were a match with another study by Saadi *et al*., (2009) who reported rs731236 had no effect and did not call for any association with asthma but other SNPs were tested within non-coding regions of VDR sequence VDR/rs3782905, VDR/rs7975232 and VDR/rs1544410, which had significant association minimize the level of Vitamin D due to an increased risk of disease. SNPs rs3782905 is in the DNA binding domain responsible for interaction with vitamin D response elements (VDREs) in target genes While rs1544410 and rs731236 were associated with PSA level and Prostate cancer risk in old African men (Emmanuel *et al*., 2015).

Holick *et al*., (2007), reported that different SNPs in the VDR gene have an etiological role in the development of diseases and may be associated with progression of the prostate disease such as prostate cancer and BPH. Genetic susceptibility of diseases leads to growing attention to genes polymorphism involved in the pathogenesis and carcinogenesis. A low level of vitamin D is a risk parameter for BPH and other diseases. The vitamin D receptor is a significant regulator of the vitamin D pathway that could regulate the conversion of serum 25 (OH) D into 1,25-dihydroxy vitamin D, which mediate downstream transcription of a series of target genes (Mi *et al*., 2017 and Madersbacher *et al*., 2019). However, the SNP rs3782905 is in the DNA binding domain responsible for interaction with vitamin D response elements (VDREs) in target genes the TaqI polymorphism is not workable but is in linkage disequilibrium with a poly-A microsatellite repeat in the 3' untranslated region (UTR) that is thought to be serious in post-transcriptional control gene expression (Holt *et al*., 2009 and Hendrickson *et al*., 2011).

## Conclusions

BPH is defined as an increase in the total number of stromal and glandular epithelial cells. Its prevalence rate is age-dependent. Old Iraqi patients with vitamin D deficiency and diabetes were found to have a larger prostate, lower urination in comparison with healthy men that mean the vitamin D deficiency implicated in the pathophysiology of BPH and can be used as an independent risk factor for BPH because of Vitamin D and VDR involved in the prostate cell division and function.

## References

1. Dasa B, Buchholz , L 2019. Benign prostate hyperplasia and nutrition. Clinical Nutrition.,33:5-11.
2. Walsh C, Kavoussi L, Partin A, Novick,A. and C. Peter(2012). Campbell-Walsh Urology 10th edition. Elsevier Inc.
3. Nickel, J., Lorne Aaron, M.; Jack Barkin, M.; Dean Elterman, D.; Mahmoud Nachabé, N. and K.,Zorn (2018). Canadian Urological Association guideline on male lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia (MLUTS/BPH) Can Urol Assoc J;12(10):.303-12.

4. Shah ,A.; Anand Srivastava, S. and C .,Karan (2018). Medical management of patients with benign prostatic hyperplasia: A study in Indian population. J Mar Med Soc.,20:104-10.
5. AlChalabi, R.; Omer, D.; Khalid, B. and H., Alamay (2019). The correlation between several biochemical parameters and UTIs with progression of BPH. Research Journal of Biotechnology., 4(1):32-37.
6. Chen, L.; Davey, S.; Evans, D.; Cox, A.; Lawlor, D.; Donovan ,J.; Yuan, W.; Day, I.; Martin, R.; Lane, A.; Rodriguez, S.; Davis, M.; Zuccolo, L.; Collin, S.; Hamdy,F.; Neal, D. and S., Lewis (2009). Genetic variants in the vitamin d receptor are associated with advanced prostate cancer at diagnosis: findings from the prostate testing for cancer and treatment study and a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.; 18:2874–2881.
7. Burke, J.; Jacobson, D.; McGree, M.; Roberts, O.; Girman,C.; Lieber,M. and S., Jacobsen (2006). Diabetes and benign prostatic hyperplasia progression in Olmsted County, Minnesota. Urology 67:22–25.
8. Cai , T.; Raffaella, S.; Irene, T.; Ilaria, C.; Gianpaolo , P.; Truls, E.; Bjerklund, J. and N.,Gabriella (2019). Current Knowledge of the Potential Links between Inflammation and Prostate Cancer., Int. J. Mol. Sci. 20,(3833):2-14.
9. Aruna, V.; Sarma,J.; Sauver,J.; Hollingsworth, D.;. Jacobson, M. and M., Dunn (2012). Diabetes Treatment and Progression of Benign Prostatic Hyperplasia in Community Dwelling Black and White Men. Urology ;79(1): 102–108.
10. Benjamin, N(2014). Hyperglycemia and Insulin Resistance and the Risk of BPH/ LUTS: an Update of Recent Literature. Curr Urol Rep. ; 15(12): 462-473.
11. Hong, Y.; Sanghun, L. and W., Sungho (2019).The preventive effect of metformin on progression of benign prostate hyperplasia: A nationwide population-based cohort study in Korea. PLOS ONE 14(7): e0219394.
12. Irwin, D.; Kopp, Z.; Agatep, B.; Milsom,I. and P., Abrams P. (2011).Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. BJU Int.; 108:1132–8.
13. Barua., S; , Somor Jyoti Borah2 , T. P. Rajeev1 (2019). Current Understanding of Diabetes Mellitus Induced Lower Urinary Tract Dysfunction. Journal of Health Research and Reviews (in Developing Countries) ., 6 ( 2 ): 50-56.
14. Bordelon, P.; Ghetu , M. and R., Langan (2009). Recognition and management of vitamin D deficiency. Am Fam Physician;80(8):841-846.
15. Adorini, L.; Penna, G. and S., Amuchastegui (2007). Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (elocalcitol). J Steroid Biochem Mol Biol, 103: 689-93.
16. Hendrickson, W.; Flavin, R.; Kasperzyk, J.; Fiorentino, M.;Fang, F.; Lis, R.; Fiore, C.; Penney, K.; Ma, J.; Kantoff, P.; Stampfer, M.; Loda, M.; Mucci, L. and E., Giovannucci (2011). Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. J Clin Oncol., 29: 2378-2385.
17. Orwoll, E.; Nielson , C. and L., Marshall (2009). Vitamin D deficiency in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* ; 94(4):1214-1222.
18. Crescioli, C.; Maggie, M. and G., Vannelli (2000). Effect of a vitamin D3 analogue on keratinocyte growth factor-induced cell proliferation in benign prostate hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab., 85:2576-83.
19. Parmeet, K.; Rituraj, K.; Lakshma, N.; Vishwajeet, S. and K., Hemant (2010).Association of Genetic Variants of the Vitamin D Receptor (VDR) Gene (Fok-I, Taq-I & Bsm-I) with Susceptibility of Benign Prostatic Hyperplasia in a North Indian Population. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 11:1005-1008.
20. Hammarsten, J.; Damber , J. and O., Johnell (2006). A low vitamin D level is an independent risk factor for the development of benign prostatic hyperplasia. Urology, 68(5): 18-26.
21. Zhang, Q. and Y., Shan (2013).Genetic polymorphisms of vitamin D receptor and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. J BUON 18: 961-969.
22. Hamasakia, T.; Inatomia, H. and T., Katohb (2002). Significance of vitamin D receptor gene polymorphism for risk and disease severity of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in Japanese. Urol Int.; 68: 226-231.

23. Giovannucci , E(2008). Vitamin D status and cancer incidence and mortality. Adv Exp Med Biol., 624: 31-42.
24. Li, R.; Jian-guo, Z.; Cong,P.; XingHua, D.; Dong-bo, Y.; Zheng-ming, L. and Z., Wei-deZhong5(2015). Association between Single Nucleotide Polymorphism of Vitamin D Receptor Gene FokI Polymorphism and Clinical Progress of Benign Prostatic Hyperplasia. Scientific World Journal ,15:1- 5.
25. Xu, Y.; He, B.; Pan , Y.; Deng, Q.; Sun, H.; Li, R.; Gao, T.; Song, G. S., Wang (2014). Systematic review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. Tumour Biology 35: 4153-4169.
26. Madersbachera, S.; Sampsonc, N. and Z., Culig(2019). Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia and Benign Prostatic Enlargement: A Mini-Review. Gerontology;65:458–464.
27. Ajayiac , A. and K. Abrahamab (2018). Understanding the role of estrogen in the development of benign prostatic hyperplasia., African Journal of Urology.,24(2):93-97.
28. Joseph, M.; Harlow, S. and J., Wei (2003). Risk factors for lower urinary tract symptoms in a population-based sample of African-American men. Am J Epidemiol.;157:906–914.
29. Kopp, W(2018). Diet-Induced Hyperinsulinemia as a Key Factor in the Etiology of Both Benign Prostatic Hyperplasia and Essential Hypertension?. Nutrition and Metabolic Insights .; 11: 1–11.
30. Zhang, W.; Zheng, X. and H., Xiao(2016). Vitamin D Deficiency as a Potential Marker of Benign Prostatic Hyperplasia. Urology.,97:212-217.
31. Elshazly, M.; Aboutaleb, H.; Shady, M .and S.,Aziz(2017). Vitamin D deficiency and lower urinary tract symptoms in males above 50 years of age . Urology Annals.,9(2):170-173.
32. Bai, Y.; Yaping, Yu.; Yu, B.; Jianrong , G.; Jingzhang , J.; Hong, L.; Jia, W.; Zhiliang, W.; Zhihua, T. and L., Jianxin (2009). Association of vitamin D receptor polymorphisms with the risk of prostate cancer in the Han population of Southern China. BMC Medical Genetics ., 10(125):1-8.
Han, J.; Du , J.; Zhang, Y.; , Qi , G.; Li , H. and Z., Yi(2016). Vitamin D receptor polymorphisms may contribute to asthma risk. Journal of Asthma .;53(8): 34-39.
33. Saadi, A.; Gao, G.; Li,H.; Wei,C.; Gong,Y. and Q., Li(2009). Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the chinese han population: a case-control study. B*MC Medical Genetics* ., 10( 71):1-7.
34. Emmanuel,Y.;Muneer,A.;Luisel, R. and W., Danyelle(2015). Vitamin D Receptor Genetic Polymorphisms Are Associated with PSA Level, Gleason Score and Prostate Cancer Risk in African-American Men. Anticancer Research, 35: 1549-1558.
35. Holick,C.; Janet, L.; Stanford,E.; Kwon,M.; Elaine, A.; Ostrander, S.; Nejentsev,A. and U., Peters(2007). Comprehensive Association Analysis of the Vitamin D Pathway Genes, VDR, CYP27B1, and CYP24A1, in Prostate Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16(10):1990-1999.
36. Mi, Y.; Yang, Z.; Chen, Z.; Li-Feng, Zhang.; Li, Z. and J., Zou(2017). Updated analysis of vitamin D receptor gene FokI polymorphism and prostate cancer susceptibility. Arch Med Sci .; 13(6): 1449–1458.
37. Madersbacher, S.; Sampson, N. and C., Zoran Culig (2019). Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia and Benign Prostatic Enlargement: A Mini-Review. Gerontology .;65:458-464.
38. Vikrant,R.; Joe, A.; Agrawal, S. and A., Devendra (2017). Vitamin D Receptor Polymorphism and Cancer: An Update. Anticancer Research., 37: 3991-4003.
39. Holt, S.; Kwon, E.; Peters, U.; Ostrander, E. and J., Stanford (2009). Vitamin D pathway gene variants and prostate cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18: 1929-1933.
40. Hendrickson, W.; Flavin, R.; Kasperzyk, J.; Fiorentino, M.; Fang, F.; Lis, R.; Fiore, C.; Penney, K.; Ma, J.; Kantoff, P.; Stampfer, M.; Loda, M.; Mucci, L. and E.,Giovannucci (2011). Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. J Clin Oncol 29: 2378-2385

# Antibacterial activity of *Cornus mas* L. fruit extracts

Ramazan Kahraman[1], Hüseyin Servi[2], Cansu Vatansever[3]

[1]School of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey,
[2]Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey
[3]Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey

Corresponding author e-mail: ecz.ramazan.kahraman@gmail.com

**Abstract**
The cornelian cherry fruit (500 g) was macerated (3 times each solvent) with hexane, ethyl acetate, methanol, and methanol:water (70:30), respectively. The main purpose of this study is to determine the antibacterial activity of fruit extracts of *Cornus mas* L. against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 and *Escherichia coli* ATCC 25922 by using broth microdilution and disc diffusion methods. The ethyl acetate, methanol, and methanol:water extracts of plant showed inhibitory activity against the tested bacteria in disc diffusion assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of ethyl acetate extract were 2 mg/mL for *E. aerogenes* and *S. aureus* and 4 mg/mL for *E. coli* and *B. cereus*. The inhibition zone diameters of ethyl acetate were 22 mm for *B. cereus,* 18 mm for *E. aerogenes* and *S. aureus*, 16 mm for *E. coli.* The most obvious inhibition zone diameters of methanol and methanol:water extracts were 16 mm and 14 mm for *B. cereus*, respectively. The methanol:water extract was effective on *E. coli* and *S. aureus* at 8 mg/mL in microdilution assay. The hexane extract was only effective on *B. cereus* at 8 mg/mL. Ethyl acetate extract was more effective on tested bacteria than other extracts.
**Keywords:** *Cornus mas*, antibacterial activity, extracts

## INTRODUCTION

The *Cornus* L. genus is a member of Cornaceae family. Cornaceae has just two genera *Cornus* (65 species) and *Alangium* (20 species). *Cornus mas* L. is known as "Cornelian cherry" in English and it is called "Kızılcık" in Turkish. The Cornelian cherry additionally acknowledged as dogwood is a tree that grows in the east and south regions of Europe and in West Asia. Cornelian cherry bushes reach 7–8 m in the top and can grow in temperate local weather on drained soils (Dinda et al., 2016). Fruits are fit to be eaten with an oval or pear-like form and ranging in shade from crimson to purple. The weight of the Cornelian cherry's fruit degrees from 2.09 to 9.17 g, relying on the plant genotype and cultivation conditions (Yılmaz et al., 2009). *C. mas* (Cornelian cherry) has been used as a traditional folk medicine for many years. Cornelian cherry showed many biological activities such as antidiabetic, anti-hyperlipidemic, anti-inflammatory, neuroprotective, anti-amnesic, hepatoprotective, anticoagulant, antimicrobial, and antioxidant activity (Dinda et al., 2016). There are many reports on the phytochemistry and biological activity of *Cornus mas* extracts in the literature. One of the most remarkable of them is *Cornus mas* L. fruit extract was investigated for antioxidant activity. Fruit extract showed a high level of antioxidant activity due to anthocyanins and phenolic compounds. (Celep et al., 2012). The biological activities of fruit extracts of *C. mas* seem to be associated with anthocyanins, iridoids, flavonoids, phenolic acids, carotenoids, and fatty acids (Deng et al., 2013). The other one of the most remarkable of them is the antimicrobial activity of *C. mas* fruits. The main purpose of this study is to determine the antibacterial activity of fruit hexane, ethyl acetate, methanol, and methanol:water (70:30) extracts of *C. mas* L. against *S. aureus*, *B. cereus*, *E. aerogenes*, and *E. coli* by using broth microdilution and disc diffusion methods.

## MATERIALS AND METHODS

### Extraction of plant material

The cornelian cherry fruit (500 g) was macerated (3 times each solvent) with hexane, ethyl acetate, methanol, and methanol:water (70:30), respectively. Each extract was concentrated under reduced pressure to give a solvent-free residue (Figure 1), and crude hexane (0.2 g), ethyl acetate (2.5 g), methanol (148.3 g) and methanol:water (41.4 g) extracts.



**Figure 1.** Evaporation of solvents

**Antibacterial Assay**

The antibacterial activity of fruit extracts was determined against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 and *Escherichia coli* ATCC 25922 by using broth microdilution and disc diffusion methods. Each microorganism was suspended in nutrient broth and suspensions were adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity. For preparing the experiment concentrations of extracts, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) is used. After preparing extracts, all extracts were sterilized by filtration through syringe filters with 0.45 µm pore size.

**Microdilution Assay**

The microdilution assays were begun with 8 mg/mL of extracts. 100 µl of nutrient broth was introduced into each well of 96 round bottoms well plate and 100 µl of fruit extracts were added into the first well and mixed. Extracts were diluted two times in each well through serial dilution that transferred of 100 ml sample to the next well. After the serial dilution step, 10 µl of the bacterial solution was added into all wells (Figure 2). The microplate was incubated at 37°C for 24 hours and MIC values of extracts were determined. Chloramphenicol was used as a positive control and all the experiments were performed in duplicate.

**Disk Diffusion Assay**

100 µl of bacterial suspensions were inoculated on nutrient agar through the spread plate culture technique. The discs (6 mm in diameter) were impregnated with 10 µl of the extracts (1 g/ml) to obtain the experiment concentration of 10 mg/disc and placed on the inoculated agar. All plates were incubated at 37°C for 24 hours (Figure 2). Antibacterial activities of extracts were evaluated by measuring the inhibition zones. Chloramphenicol (30 µg/disk) was used as a positive control, physiological saline was used as a negative control. All the experiments were performed in duplicate.

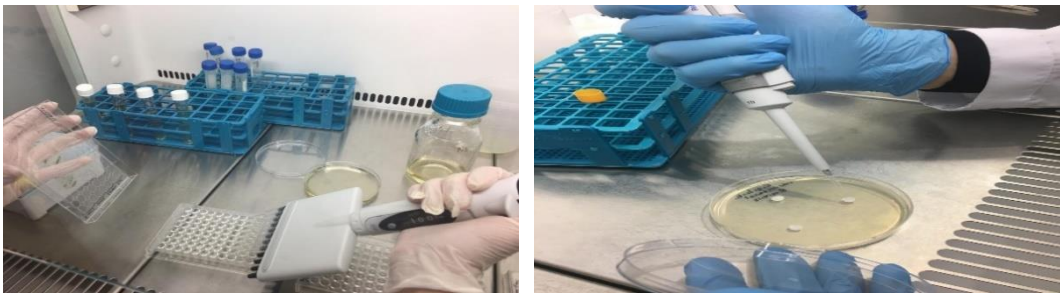


**Figure 2.** Broth microdilution method (Left), Disk diffusion method (Right)

**RESULTS AND DISCUSSION**

The ethyl acetate, methanol, and methanol:water extracts of plant showed inhibitory activity against the tested bacteria in disc diffusion assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of ethyl acetate extract were 2 mg/mL for *E. aerogenes* and *S. aureus* and 4 mg/mL for *E. coli* and *B. cereus*. The methanol:water extract was effective on *E. coli* and *S. aureus* at 8 mg/mL in microdilution assay. The hexane extract was only effective on *B. cereus* at 8 mg/mL (Table 1 and Figure 3).

**Table 1.** The results of broth microdilution assay

| Extract | Gram-negative bacteria | | Gram-positive bacteria | |
|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* | *E. aerogenes* | *S. aureus* | *B. cereus* |
| Hexane | Not effective | Not effective | Not effective | 8 mg/mL |
| Ethyl acetate | 4 mg/mL | 2 mg/mL | 2 mg/mL | 4 mg/mL |
| Methanol | 8 mg/mL | 8 mg/mL | 8 mg/mL | 8 mg/mL |
| Methanol:water | 8 mg/mL | Not effective | 8 mg/mL | Not effective |



**Figure 3.** Results of broth microdilution assay

The inhibition zone diameters of ethyl acetate were 22 mm for *B. cereus*, 18 mm for *E. aerogenes* and *S. aureus*, 16 mm for *E. coli*. The most obvious inhibition zone diameters of methanol and methanol:water extracts were 16 mm and 14 mm for *B. cereus*, respectively (Table 2 and Figure 4).
The methanol and water extracts of *C. mas* fruits were investigated for antimicrobial and antioxidant activities. Both extracts showed the highest antimicrobial activity against *S. aureus*. The inhibition zone diameter was 25 mm and the MIC value was 0.156 mg/mL (Yiğit, 2018). In our study, the methanol and methanol:water extracts had activity against *S. aureus*. Our findings were in agreement with the literature. There are differences in MIC value and inhibition zone diameter between current and previous studies. These controversial results can be related to different extraction methods, extracts concentration, constituents of extracts, storage method of extracts, microorganism types and antimicrobial sensitivity test. Also, the chemical composition and antimicrobial activities of the plant may change rely on geographical regions.

**Table 2.** The results of disc diffusion assay

| Extract | Gram-negative bacteria | | Gram-positive bacteria | |
|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* | *E. aerogenes* | *S. aureus* | *B. cereus* |
| Ethyl acetate | 16 mm | 18 mm | 18 mm | 22 mm |
| Methanol | 10 mm | 9 mm | 12 mm | 16 mm |
| Methanol:water | 9 mm | 8 mm | 10 mm | 14 mm |

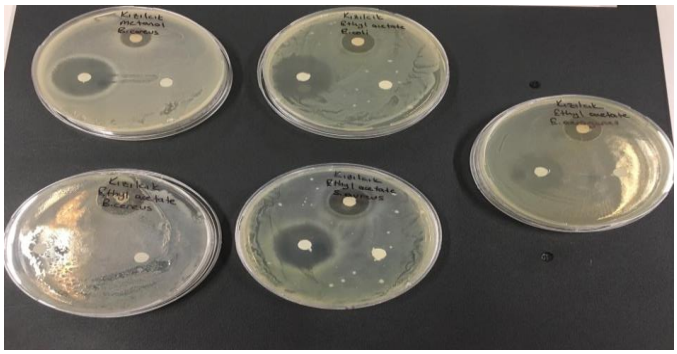


**Figure 4.** Results of disk diffusion assay

## CONCLUSION

The ethyl acetate extract was more effective on tested bacteria than other extracts. Further studies on extracts of *Cornus mas* are required to improve the extraction procedure and to isolate active compounds of extracts that are responsible for its antibacterial activities.

## REFERENCES

Celep E, Aydın A, Yesilada E 2012. A comparative study on the in vitro antioxidant potentials of three edible fruits: Cornelian cherry, Japanese persimmon and cherry laurel. Food Chem Toxicol., 50:3329–3335.

Deng, S., West, B.J., Jensen, C.J. (2013). UPLC-TOF-MS characterization and identification of bioactive iridoids in *Cornus mas* fruit. J. Anal. Methods Chem., 1-7.

Dinda B., Kyriakopoulos A. M., Dinda S., Zoumpourlis V., Thomaidis N. S., Velegraki A 2016. *Cornus mas* L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry. J. Ethnopharmacol., 193: 670–690.

Yigit, D 2018. Antimicrobial and Antioxidant evaluation of fruit extract from *Cornus mas* L. Aksaray University Journal of Science and Engineering, 2(1): 41-51.

Yilmaz KU, Ercisli S, Zengin Y, Sengul M, Kafkas EY. 2009. Preliminary characterisation of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes for their physico-chemical properties. Food Chem., 114:408–412.

# Isolation and Identification of Probiotics from Whey

Pervin Soyer[1*], Yağmur Tunalı[1]

[*1]Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Eskişehir, Turkey.

*pervinsoyer@gmail.com

**Abstract**

The term "probiotic" is defined as beneficial, living, microbial nutrients that strengthen the intestinal system of the human microbiota. Recently, there has been an intense interest in obtaining probiotics from fermented milk products whey is the leftover liquid in milk production, and contains at least half of the nutrients in milk such as lactose, serum proteins, minerals, fats and vitamins. In this research, whey was used as a source to isolate probiotics. Whey is a medium rich in probiotic bacteria. Probiotic bacteria have therapeutic effects such as improving lactose intolerance, protection against intestinal infestations, lowering cholesterol in serum, increasing immune defense, anticarcinogenic and antioxidative activities. In the study, a comprehensive species identification and characterization was made by the morphological, biochemical and molecular methods. Isolated strains were identified by Gram staining, molecular identification 16S rRNA gene sequencing, biochemical identification catalase and API (Analytic Profile Index) assays. Finally, the isolated probiotic strains belonging to 2 genera *(Lactobacillus* and *Enterococcus)* were identified.

**Keywords:** Probiotics, Whey, *Lactobacillus, Enterococcus*.

## INTRODUCTION

Milk and dairy products especially cheese, whey or yoghurt are the important sources for isolation of probiotics since the importance of probiotics for human health has been revealed. Whey contains a rich and heterogeneous mixture of secreted proteins with a lot of functional attributes for biological purposes. The main biological activities of whey proteins are suggested to include cancer prevention, increase of gluthatione levels, antimicrobial function and increase of satiety response (Madureira et al., 2011). Whey-based dairy beverage contains a lot of different probiotic microorganisms that have beneficial properties for inhibit pathogens to prevent human body against diseases. Whey, produced in very high amounts by dairy factories during the production of various cheese based products. It is also rich in organic material with considerable polluting potential. Thus, the aim of this research is isolation and identification of probiotic bacteria from different whey samples by using biochemical and molecular techniques.

## MATERIALS AND METHODS

### 1.Isolation and Morpohological Analysis

The whey was taken randomly from 4 different places that make various cheeses and dairy products. Samples were taken aseptically and brought to the laboratory. Samples were used directly and also diluted to $10^{-1}$,$10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$ and $10^{-5}$ in 0.9 % NaCl solution. 50 µL of the each samples and dilutions were plated into MRS (Man, Rogosa and Sharpe) and M17 agar. The plates were incubated at 37 °C for one day under anaerobic conditions. After incubation, single colonies were selected and transferred into sterile medium with streak plate technique. This step was repeated until purified colonies were observed. The morphological analysis of this colonies determined by using Gram staining method and stained cultures were examined under light microscope.

### 2.Biochemical Analysis

### 2.1. Catalase Test

One loop of the single, pure colony was smeared on glass and then 3% $H_2O_2$ reagent was dropped. A positive result was interpreted with gas bubbles formation.

### 2.2.API (Analytical Profile Index) System

API 50 CHL and API 20 Strep kits of BioMeriéux were used for biochemical identification method by Analytical Profile Index (API) system. The tests were carried out according to the rules determined by the manufacturer firm. It is performed with API 50 CHL system, which has 50 biochemical tests that test the

fermentation of carbohydrates and carbohydrate metabolism. The cultures adjusted to McFarland 2 were transferred to API kits as appropriate by the manufacturer procedures and incubated at 37 ° C for 48 hours. API 20 Strep is a standardized method that combines 20 chemical tests with a large capacity. The API 20 Strep strip consists of 20 microtubes containing dehydrated substrates for the determination of enzymatic activity or fermentation of sugars. Cultures adjusted to McFarland 4 were transferred to API kits as appropriate by the manufacturer procedures and incubated at 37 ° C for 24-48 hours. After incubation, the results were evaluated as + / - (present / absent) according to the color changes of the wells on the kit. + (present) values were evaluated by the APIWeb Software system for numerical analysis.

**3.Molecular Analysis**

Molecular identification of the cultures was performed as follows. GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA isolation kit was used for genomic DNA isolation according to the manufacturer's procedures. DNA quantity and quality were spectrophotometrically determined with Thermo Scientific Nanodrop 2000 device and confirmed by agarose gel electrophoresis. The gregions targeted for species identification were amplified using universal 16S rRNA bacterial primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primers. The PCR products were generated using an initial denaturation step of 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 40 s, annealing at 57°C for 45 s, elongation at 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 5 min. A single-stage PCR procedure was performed to reproduce the approximately 1470 base region. PCR reaction was performed with Solis Biodyne FIREPol® DNA Polymerase Taq polymerase enzyme. After PCR step, a single band was obtained on agarose gel and it was observed that the PCR process was successful. The PCR product was purified by following the manufacturer's procedures with the ExoSAP-IT ™ PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific) purification kit. For Sanger Sequencing, the ABI 3730XL Sanger sequencing device (Applied Biosystems) and BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit were used (Applied Biosystems). The readings obtained with the 27F and 1492R primers were contiguous to form a consensus sequence. CAP contig assembly algorithm was used in BioEdit software to perform this process. Homology of these sequences of isolates were analyzed by using BLAST program (Rintala et al., 2001; Singh et al., 2009).

**RESULTS and DISCUSSION**

In the present study, 35 pure cultures were isolated from collected whey samples. Gram staining method was applied all of these isolates. Some of them are shown in images below **(Figure 1.)**. Based on the results of the morphological analysis, colonies were similar in color, shape and surface. The small white colonies have a flat edge, round shapes with varying sizes and shiny surfaces form with the diameter of 0.1-0.5 mm as well as Gram-positive.

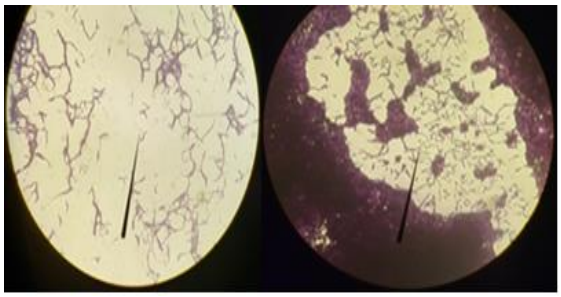


**Figure 1.** Microscopic (40x) images of pure probiotic cultures

The positive reaction of catalase test is indicated by the formation of $O_2$ gas bubbles as the breakdown of $H_2O_2$ by catalase enzyme produced by the bacteria. The negative reaction to calatase test is indicated by no formation of gas bubbles (Hendrati et al., 2017). In this research, the probiotic cultures that isolated from whey were catalase negative. The biochemical identification for 4 isolates confirmed by API systems. 112121 and 12111 coded isolates were *Enterococcus faecium* 90-99%, 121211 was *Lactobacillus fermentum* 90-99% and the other isolate 3111 was *Enterococcus lactis* 90-99%. Other similarity rates of isolates were shown **in Table 1**

**and 2.** It was observed 4 isolates that tested belong in probiotic bacteria group and showed different degrees of similarity.

**Table 1.** API 50 CHL results

| Codes of isolates | Highest similarity rate 90-99% | Moderate similarity rate 55-85% | Lowest similarity rate 0.1-10% |
|---|---|---|---|
| **112121** | *Enterococcus faecium* | *Lactococcus lactis* | *Lactobacillus brevis* |
| **121211** | *Lactobacillus fermentum* | - | *Lactobacillus brevis* |
| **3111** | *Enterococcus lactis* | *Lactobacillus plantarum* | *Lactococcus lactis* |
| **12111** | *Enterococcus faecium* | *Lactococcus lactis* | *Lactobacillus brevis* |

**Table 2.** API 20 Strep results

| Codes of isolates | Highest similarity rate 90-99% | Moderate similarity rate 55-85% | Lowest similarity rate 0.1-10% |
|---|---|---|---|
| **112121** | *Enterococcus faecium* | *Enterococcus durans* | *Lactococcus lactis* |
| **121211** | *Lactobacillus fermentum* | *Enterococcus durans* | *Leuconostoc sp.* |
| **3111** | *Enterococcus lactis* | *Enterococcus faecium* | *Enterococcus feacalis* |
| **12111** | *Enterococcus faecium* | *Enterococcus durans* | *Lactococcus lactis* |

By the results of 16S rRNA molecular identifaction technique, BLAST analysis of the isolates showed that 100% similarity with; 112121 coded isolate is *Enterococcus faecium* (Accession Number: MH817719.1), 121211 coded isolate is *Lactobacillus fermentum* (Accession Number: MH973188.1), 3111 coded isolate is *Enterococcus lactis* (Accession Number: MF098014.1) and 12111 is *Enterococcus faecium* (Accession Number: MH817719.1)

## CONCLUSION

In this study, total 35 probiotic cultures were isolated from 4 different whey samples. Determination of probiotic cultures were based on the morphological, biochemical, and molecular methods. The isolates were examined according to their colony morphology by Gram reaction, catalase, API 50 CHL, API 20 Strep tests for biochemical reaction and 16S rRNA identifacation method for molecular identification. The 4 different Gram-positive and catalase negative colonies were taken to API system and molecular tests, the similarities of the selected pure probiotic cultures showed same similarity rates. By the results of these two identification tests *Enterococcus faecium, Lactobacillus fermentum* and *Enterococcus lactis* probiotic bacteria were isolated. The probiotic dairy product whey was shown to be a beneficial vehicle for delivery of the probiotic bacteria. Further studies are needed in order to observe different biological activities of whey samples.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Anadolu University Scientific Research Projects (BAP) Commission. Project number is 1802S028. We greatly acknowledge the financial support.

**REFERENCES**

Hendratı PM, Kusharyatı D F, Ryandını D, Oedjıjono O 2017. Characterization of Bifidobacteria from infant feces with different mode of birth at Purwokerto, Indonesia. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 18(3): 1265-1269.

Madureira AR, Pintado AI, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX 2011. Rheological, textural and microstructural features of probiotic whey cheeses. LWT-Food Science and Technology, 44(1): 75-81.

Rintala H, Nevalainen A, Rönkä E, Suutari M 2001. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of Streptomycetes. Molecular and cellular probes, 15(6): 337-347.

Singh V, Praveen V, Khan F, Tripathi CKM 2009. Phylogenetics of an antibiotic producing Streptomyces strain isolated from soil. Bioinformation, 4(2): 53.

# Boyar Maddelerin Güneş Işığı ile Fotokimyasal Oksidasyonunun İncelenmesi

Pelin Saraç, Feryal Akbal

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, Türkiye, 55200

Mart, 2020

E-mail: p.sarac55@gmail.com

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı; fotokimyasal oksidasyon prosesinin güneş ışığı altında gerçekleştirilerek, boyar madde giderimine güneş ışığı etkisinin incelenmesidir. Boyar madde olarak Telon Red FRL kullanılmıştır. Fotokimyasal oksidasyon prosesinde oksidan olarak hidrojen peroksit ve peroksimonosülfat, katalizör olarak ise demir ($Fe^{+2}$) kullanılmıştır. Fotokimyasal oksidasyon deneyleri boyar maddenin doğal pH(5,4) değeri ve asit pH(3,0) değerinde gerçekleştirilmiştir. İki farklı oksidanın ve iki farklı pH değerinin boyar madde giderim verimine etkisi kıyaslanmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda, güneş ışığı altında boyar madde gideriminde peroksimonosülfatın hem doğal pH hem de asit pH değerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Hidrojenperoksit oksidanında ise asit pH değerinde daha yüksek giderim verimleri elde edilmiştir. Boyar madde gideriminde, güneş ışığının önemli bir fayda sağladığı kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Fotokimyasal oksidasyon, sentetik boyar madde, güneş ışığı, oksidan, katalizör

## Investigation of Photochemical Oxidation of Dyestuffs by Sunlight

## ABSTRACT

The aim of this research is to analyse the effect of sunlight in colourant removal, by carrying out photochemical oxidation process under sunlight. As colourant, Telon Red FRL was used. In photochemical oxidation process, Hydrogenperoxide and peroxymonosulfate were used as oxidant and iron (Fe+2) was used as catalyzator. Photochemical oxidation experiments were carried out in the colourant's natural pH value (5,4) and acid's pH value (3,0). Two different oxidant's and two different pH values' effect on the colourant removal efficiency were compared. As a result of experimental studies, it was observed that in colourant removal under sunlight, peroxymonosulfate was both efficient in natural pH value and acid pH value. In hydrogenperoxide oxidant, in acid pH values, higher removal efficiency was obtained. It was precipitated that sunlight was significantly beneficial in colourant removal.

**Keywords:** Photochemical oxidation, synthetic dyestuff, sunlight, oxidant, catalyzer.

## GİRİŞ

Sentetik boyar maddeler çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle tekstil endüstrisinde yoğun olarak kullanılan boyar maddelerin büyük kısmı tehlikeli kirleticilerdir. Boyar maddeler genel olarak bozunmaya dirençli ve çevrede uzun süreli kirlilik oluşturabilecek maddelerdir [1]. Bu sebeple atıksudan boyar madde giderimi oldukça önemlidir.Boyar madde gideriminde adsorpsiyon, koagülasyon-flokülasyon gibi çeşitli fizikokimyasal yöntemler kullanılabilmektedir. Bununla birlikte bu yöntemlerle boyar maddelerin gideriminde faz transferi gerçekleşmektedir. Biyolojik prosesler ise boyar maddelerin gideriminde çoğunlukla etkili olmamaktadır. Kirletici özelliği yüksek ve bozunmaya dirençli olan boyar maddelerin gideriminde yüksek verim elde edilmesi ve atıksu geri kazanımında kullanılabilir olması, ileri oksidasyon proseslerini cazip hale getirmektedir [2,3]. İleri oksidasyon yöntemlerinin arasından olan Foto-Fenton yöntemi yoğun ışık ihtiyacı duyan ve ışık etkisinde boyar madde gideriminin yapıldığı yöntemdir.

## MATERYAL ve METOT

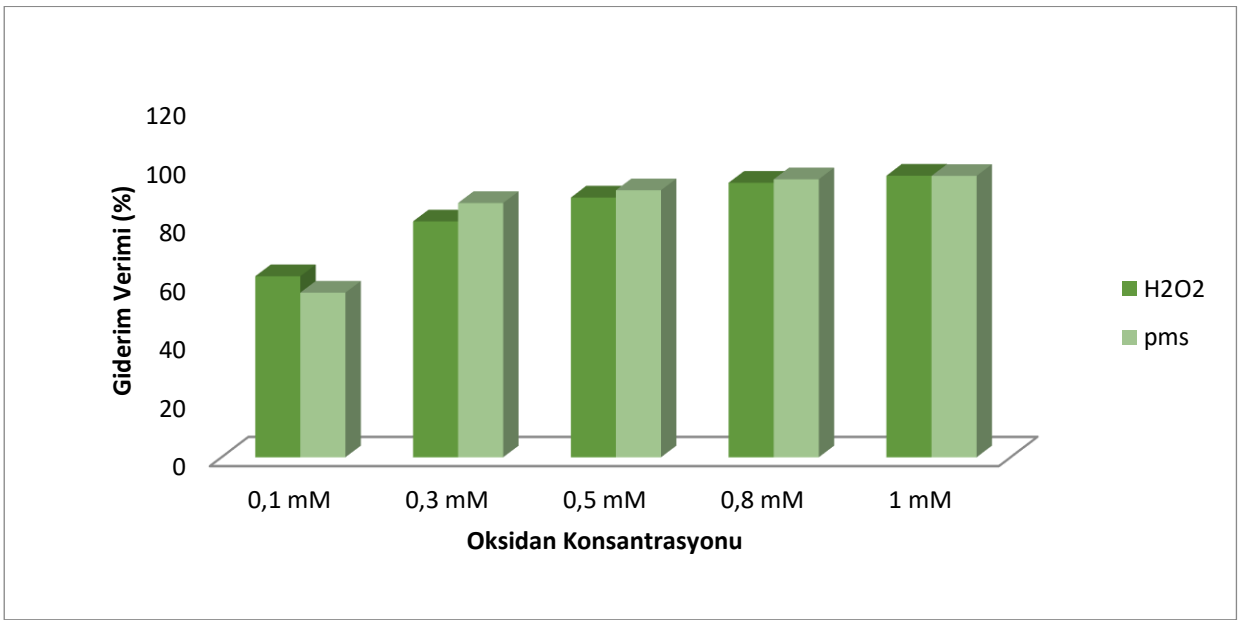
Fenton reaksiyonu tamamen organik kirletici maddeleri mineralize edemez. Ayrıca, bu yöntemin en büyük dezavantajı demir ve kirletici moleküllerin topaklanmasından kaynaklanan çamur oluşumudur. Ultraviyole (UV) radyasyonu, görünür ışık veya her ikisinin kombinasyonu kullanıldığında, işlem foto-Fenton olarak adlandırılır. Foto-Fenton işleminin çeşitli avantajları vardır; özellikle degradasyon oranının artması önemli bir avantajdır. Ek olarak, hidroksil radikalleri güneş enerjisi kullanılarak üretilebilir. Alternatif enerji kaynaklarını test eden çalışmalar, ışık kaynağı olarak güneş ışığı kullanılan foto-Fenton işleminin ekonomik bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir [4].

Deneysel çalışmalar güneş ışığı altında yapılmıştır. Boyar madde olarak Telon Red FRL kullanılmıştır. Oksidasyon prosesinde demir kaynağı olarak Fe(II), oksidan kaynağı olarak ise peroksimonosülfat (pms) ve hidrojenperoksit ($H_2O_2$) kullanılmış ve boyar madde gideriminde etkileri kıyaslanmıştır. Telon Red FRL'nin doğal pH (5,4) ve asit pH (3,0) değerinde güneş ışığı ile oksidasyonu araştırılmıştır. Böylece hem oksidan türünün hem de pH değerinin oksidasyona etkisi incelenmiştir.
Çalışmalar, 100 ppm konsantrasyonda 25 mL boyar madde çözeltileri ile yapılmış olup demir dozları sabit tutulup; oksidanlar 0,1mM - 0,3mM - 0,5mM - 0,8mM - 1mM dozlarında kullanılmıştır. Demir ve oksidan eklenen numuneler 10'ar dakika süre ile güneş ışığına maruz bırakılmıştır. Demirin ayrılması için boya çözeltilerine kireç ilave edilerek 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra boya çözeltilerinin 495 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

**BULGULAR ve TARTIŞMA**

Güneş ışığı ile oksidasyonun verimi çözeltinin pH değeri ve oksidan miktarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [5]. Özellikle oksidan maddenin miktarının artması renk giderim veriminde önemli bir artışa sebep olmuştur.
Hidrojenperoksit ile asit pH (3,0) değerinde yürütülen deneylerde 0,1mM ile 1mM arasında değişen oksidan konsantrasyonları kullanılmış ve %61,69 ile %95,97 arasında değişen renk giderim verimleri elde edilmiştir.

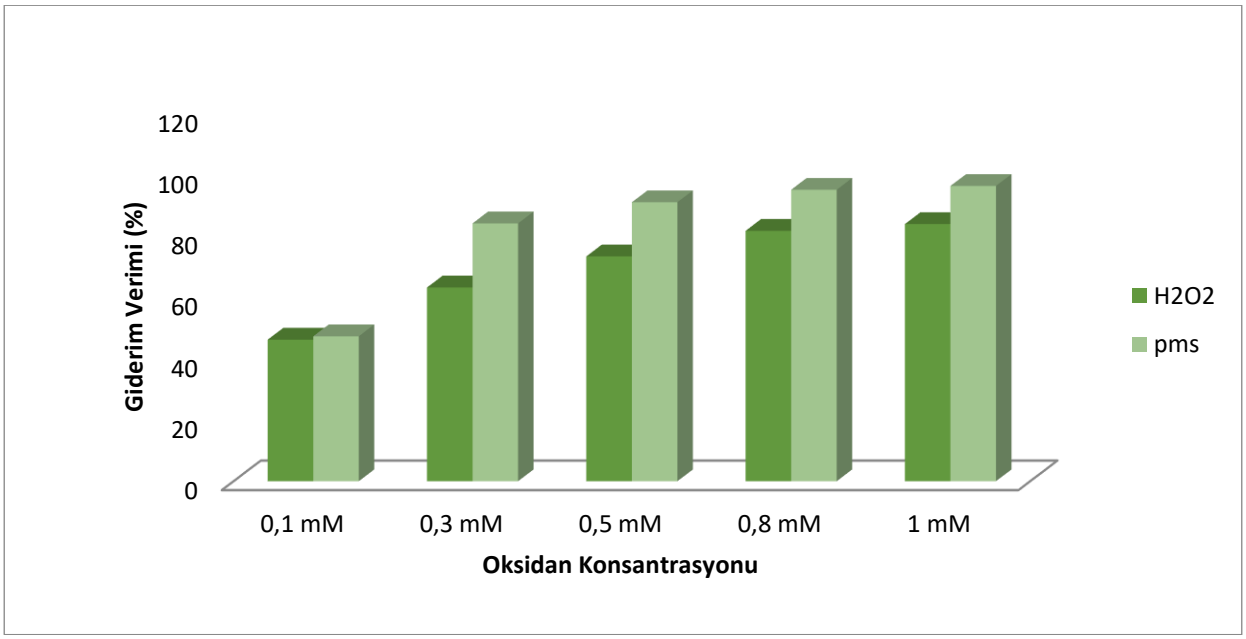
Peroksimonosülfat ile yürütülen deneylerde de 0,1mM ile 1mM konsantrasyon aralığında çalışılmış ve %56,11 - %95,90 arasında değişen renk giderim verimleri elde edilmiştir.




Grafik 1. Oksidan dozunun asit pH (3,0) değerinde Telon Red FRL giderimine etkisi

Hidrojenperoksit ile doğal pH (5,4) değerinde yürütülen deneylerde 0,1mM - 1mM konsantrasyon aralığında çalışılmış ve %46,18 ile %83,90 arasında değişen renk giderim verimleri elde edilmiştir.

Peroksimonosülfat ile yürütülen deneylerde 0,1mM - 1mM arasında değişen oksidan konsantrasyonları kullanılmış ve %47,28 - %96,32 arasında değişen renk giderim verimleri elde edilmiştir. Yapılan deneylerde oksidan konsantrasyonu arttıkça renk giderim veriminin de arttığı gözlenmiştir.




Grafik 2. Oksidan dozunun doğal pH (5,4) değerinde Telon Red FRL giderimine etkisi

Deneysel çalışmalar hidrojenperoksit ve peroksimonosülfat konsantrasyonunun artmasıyla renk gideriminin arttığını ortaya koymuştur. Elde edilen veriler peroksimonosülfatın hem asit pH (3,0) hem de doğal pH (5,4) değerinde boyar madde gideriminde etkili olduğunu göstermiştir. Hidrojenperoksit ise doğal pH değerine göre asit pH değerinde daha etkili olmuştur.

Birçok endüstride boyar madde kullanılmakla birlikte, özellikle tekstil endüstrisinde yoğun olarak boyar madde kullanımı ve yüksek su tüketimi sebebiyle atıksudan boyar madde giderimi oldukça önemlidir [1]. Boyar madde içeren atıksuların arıtılması ve tekrar kullanımı, mevcut su kaynaklarının verimli kullanılmasının yanı sıra sürdürülebilir üretim yapılmasına da imkan sağlayacaktır. Bu kapsamda güneş ışığı ile oksidasyon prosesi ile enerji tüketimini azaltarak atıksuların verimli olarak arıtımının sağlanabilmesi oldukça önemlidir.

## SONUÇ

Yapılan deneysel çalışmalarda güneş ışığı ile fotokimyasal oksidasyonun boyar madde gideriminde etkili olduğu gözlenmiştir. Kullanılan her iki oksidan maddenin de optimum miktarı 1mM olarak belirlenmiştir. Sentetik boyar madde gideriminde 1mM peroksimonosülfat (pms) oksidanı ile boyanın doğal pH (5,4) değerinde arıtım veriminin en yüksek olduğu görülmüştür. Bu alanda çalışmaların güneş ışığı etkisiyle yapılabileceği, güneş ışığı etkisinin önemli bir fayda sağladığı sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

[1] Hernandez-Rodriguez M.J., Fernandez-Rodriguez C., Dona-Rodriguez J.M., Gonzalez-Diaz O.M., Zerbani D., Pena J.P., Treatment of effluents from wool dyeing process by photo-Fenton at solar pilot plant, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2/1 (Mart 2014), 163-171.

[2] Dhatshanamurthi P., Shanthi M., Swaminathan M., An efficient pilot scale solar treatment method for dye industry effluent using nano-ZnO, Journal of Water Process Engineering, 16 (Nisan 2017), 28-34.

[3] Brillas E., A review on the photoelectro-Fenton process as efficient electrochemical advanced oxidation for wastewater remediation. Treatment with UV light, sunlight, and coupling with conventional and other photo-assisted advanced technologies, Chemosphere, 250 (2020), 126198.

[4] Chacon J. M., Leal M. T., Sanchez M., Bandala E. R., Solar photocatalytic degradation of azo-dyes by photo-Fenton process, Dyes and pigments, 69 (2006), 144-150.

[5] Ghaly M. Y., Farah J. Y., Fathy A. M., Enhancement of decolorization rate and COD removal from dyes containing wastewater by the addition of hydrogen peroxide under solar photocatalytic oxidation, Desalination, 217 (2007), 74–84.

# Determination of antibacterial activity of *Rosa canina* L. fruit extracts

Nazım Güner[1*], Cansu Vatansever[2], Hüseyin Servi[3]

[1*]Faculty of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey
[2]Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey
[3]Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey

*Corresponding author e-mail: nazim.guner@ogr.altinbas.edu.tr

**Abstract**
The hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the fruit parts of *R. canina* were obtained by maceration method with 500 g *R. canina* fruit. The aim of current study is to determine the antibacterial activity of *Rosa canina* L. fruit extracts against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 and *Escherichia coli* ATCC 25922 by using broth microdilution and disc diffusion methods. The experiments were started 8 mg/mL of extracts for broth microdilution assay and 10 mg/disc of extracts were used for disc diffusion assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of hexane extract were 8 mg/mL for all bacteria. The MIC values of ethyl acetate were 4 mg/mL for *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and 8 mg/mL for *E. aerogenes.* The inhibition zone diameters of ethyl acetate extract were 20 mm for *B. cereus*, 14 mm for *E. coli*, 12 mm for *S. aureus* and *E. aerogenes*. The MIC values of methanol extract were 8 mg/mL for all bacteria. The inhibition zone diameters of methanol extract were 18 mm for *B. cereus*, 14 mm for *S. aureus* and 12 mm for *E. coli* and *E. aerogenes*.

**Keywords :** *Rosa canina*, antibacterial activity, extract

## INTRODUCTION

*Rosa canina* L. (Rosaceae), known as “dog rose”, is a prickly shrub (1–3 m high) with fragrant pink or white flowers. This species has been evaluated for its food-related biological properties, and a multiple functional uses have been suggested. For example, teas made from the fruits of this plant called “rose hips” have mild laxative and diuretic tendencies (Chrubasik et al., 2008). They have also been used for the prevention and the treatment of common cold, influenza-like infections, infectious diseases, for vitamin C deficiency, fever, general exhaustion, gastric spasms, prevention of gastritis and gastric ulcers, diarrhea, gallstones and gallbladder discomforts, urinary tract diseases and discomforts, inflammatory disorder, arthritis, nephritis, rheumatism, gout, sciatica, diabetes, inadequate peripheral circulation, and lung ailments (Ercisli, 2007). For nutritional purposes, rose hips are used for the production of marmalade, jam, dessert soup, wine and juices. Ground in a hand mill and cooked with milk, they could be used as children’s snack and baby food as reported by the latter authors. The pseudo-fruit of *Rosa canina* L. (Rosaceae) consists of a u-shaped receptacle with numerous achenes inside. The pseudo-fruit is rich in Vitamin C and their fresh and dried products are frequently used as herbal tea. Dog rose pseudo-fruit is traditionally applied for the prevention and therapy of common cold, prevention of inflammation of the gastric mucosa and gastric ulcer, and gallstones and biliary complaints. It is also used as a laxative, for disorders of the kidney and the lower urinary tract. In addition, it is used as a diuretic in the case of dropsy (Rovna K. 2015). In Tunisia, *R. canina* known as “Nesri” is used for the production of aromatic water called “Nesri water”. The latter, usually obtained by hydrodistillation of the flowers, is highly appreciated and consumed as healthpromoting product as well as to prevent cardiovascular diseases, although no pharmacological investigations have supported this application so far. Additionally, this aromatic water is widely used as a flavouring agent of drinks, for the production of jam, marmalade, and the special traditional cake of Zaghouan (traditional area of cultivation of R. canina in north eastern Tunisia).

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

Sample which is 500 mg fruit part of dried *Rosa canina* L. is obtained and made ready for the maceration method and antibacterial assay (Figure 1).



**Figure 1.** The dried fruits of *Rosa canina* L.

**Extraction**

The dried fruits of *R. canina* was macerated with three different solvents from the lowest polarity level to highest. These are hexane, ethyl acetate, and methanol in order. Samples are dissolved in solvents for a day and this application repeated 3 times for every solvent. After consisting of 3 extracts and solvent mixing is collected to a storage bottle. In this process, products are protected light and high temperatures. After that, products are decomposed from the solvent by using rotary evaporation by using boiling point differences. Pure extracts are obtained and dried for the antibacterial assay.

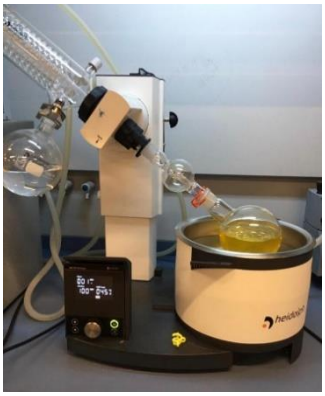


**Figure 2.** Rotary evaporation for removing solvents



**Figure 3.** Drying extracts with azote

**Antibacterial Assay**

Antibacterial activity of extracts was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus.cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 by using broth microdilution and disc diffusion methods. Bacteria were integrating into 5 ml nutrient broth and Mc Farland set 0.5. Each extract was prepared in such a way that the final concentration would be 16 mg with %10 DMSO and extracts are sterilized through the 0.45 µm pore size filter.

**Microdilution Assay**

In order to determine MIC, the broth microdilution method was used. 100 µl nutrient broth put in every well of 96 round bottoms well plate and 100 µl of each extract is put in only first well. 100 µl is taken from the first and it is transferred to others through serial dilution. 10 ml of bacterial suspension were added to each well in order (Figure 4). For positive control, chloramphenicol was used. All process is done duplicated. The microplate has waited in the incubator at 37°C for 24 hours.

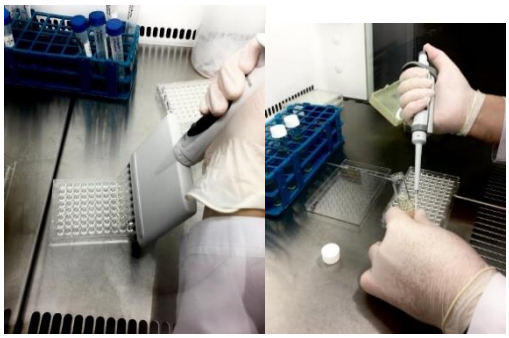


**Figure 4.** Preparation of broth microdilution method

**Disk-diffusion Method**

Bacteria were planted in nutrient agar medium from 100 µl of bacterial suspension by using spread plate culture technique. Antibiotic discs (Whatman papers) which are 6 mm in diameter were placed on 10 µl of extracts (1 g/mL) to provide the experiment concentration of 10 mg/disc surfaces by means of sterile forceps, 3 in each medium. 10 µl of physiological saline (for a negative control) and 10 µl of chloramphenicol antibiotics were absorbed in the other disc (for positive control). This process is applied 2 times and all plates are incubated in the incubator at 37°C for 24 hours.



**Figure 5.** Preparation of disk-diffusion method

**RESULTS**

Hexane extract showed inhibitory activity against test microorganisms at 8 mg/mL in MIC assay. The methanol and ethyl acetate extract showed inhibitory activity against all bacteria. The MIC values of ethyl acetate extract were 8 mg/mL for *E. aerogenes* and 4 mg/mL for *E. coli*, *S. aureus* and *B. cereus* (Table 1). The inhibition zone diameters of ethyl acetate extract were 20 mm for *B. cereus*, 14 mm for *E. coli*, 12 mm for *E. aerogenes* and *S. aureus*. The MIC values of methanol extract were 8 mg/mL for all bacteria. The inhibition zone diameters of methanol extract were 18 mm for *B. cereus*, 14 mm for *S. aureus*, 12mm for *E. coli* and *E. aerogenes* (Table 2).

**Table 1.** The results of broth microdilution assay

| Extract | Gram-negative bacteria | | Gram-positive bacteria | |
|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* | *E. aerogenes* | *S. aureus* | *B. cereus* |
| Hexane | 8 mg/mL | 8 mg/mL | 8 mg/mL | 8 mg/mL |
| Ethyl acetate | 4 mg/mL | 8 mg/mL | 4 mg/mL | 4 mg/mL |
| Methanol | 8 mg/mL | 8 mg/mL | 8 mg/mL | 8 mg/mL |

**Table 2.** The results of disc diffusion assay

| Extract | Gram-negative bacteria | | Gram-positive bacteria | |
|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* | *E. aerogenes* | *S. aureus* | *B. cereus* |
| Ethyl acetate | 14 mm | 12 mm | 12 mm | 20 mm |
| Methanol | 12 mm | 12 mm | 14 mm | 18 mm |

## DISCUSSION

The ethanol and methanol extracts of the flower of *R. canina* were investigated for antimicrobial activity. The ethanol extract showed strong activity against *E. coli* and the methanol extract had the highest activity against *Pseudomonas aeruginosa* (Rovna et al., 2015). The antimicrobial activity of hexane, chloroform, acetone, ethyl acetate, methanol and water extracts of fruit of *R. canina* from Iran was studied. The hexane and chloroform extracts did not show any activity against tested microorganisms. The methanol extract was the most effective against all bacteria. The highest MIC value of methanol extract was 2 mg/mL for *S. aureus.* Also, the acetone, ethyl acetate and water extracts were effective against *S. aureus* (Montazeri et al., 2011). In the current study, the ethyl acetate and methanol extracts were more sensitive against *B. cereus*. And the hexane extract showed activity against tested microorganism. These controversial results can be related to different extraction methods, extracts concentration, constituents of extracts, storage method of extracts, microorganism types and antimicrobial sensitivity test.

## CONCLUSION

The hexane, ethyl acetate and methanol extracts of *R. canina* showed activity against all bacteria at different concentrations. The ethyl acetate extract was more effective against all bacteria than the other extracts.

## REFERENCES

Chrubasik C, Roufogalis BD, Muller-Ladner U, and Chrubasik S 2008. A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. Phytotherapy Research, 22(6):725–733

Ercisli E 2007. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. Food Chemistry, 104(4): 1379–1384.

Montazeri N, Baher E, Mirzajani F, Barami Z, Yousefian S 2011. Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran. J. Med. Plant. Res., 5(18):4584-4589.

Rovná K, Petrova J, Terentjeva M, Cerna J, Kacaniova M 2015. Antimicrobial activity of *Rosa canina* flowers against selected microorganisms. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 4:62- 64.

# Determination of antibacterial activity of *Prunus laurocerasus* L. fruit extracts

Nazım Güner[1*], Cansu Vatansever[2], Hüseyin Servi[3]

[1*]Faculty of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey
[2]Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey
[3]Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Altınbaş University, Istanbul, Turkey

*Corresponding author e-mail: nazim.guner@ogr.altinbas.edu.tr

**Abstract**
The hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the fruit parts of *P. laurocerasus* were obtained by the maceration method. The aim of current the study is to provide information about the antibacterial activity of *P. laurocerasus* fruit extracts against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 and *Escherichia coli* ATCC 25922 by using broth microdilution and disc diffusion methods. The experiments were started with 8 mg/mL of extracts for broth microdilution assay and 10 mg/disc of extracts were used for disc diffusion assay. The hexane extract did not show inhibitory activity for all bacteria. The ethyl acetate extract showed inhibitory activity against all bacteria in both assays. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of ethyl acetate extract were 4 mg/mL for *S. aureus,* 8 mg/mL for *E. aerogenes*, *B. cereus* and *E. coli.* The inhibition zone diameters of ethyl acetate extract were 18 mm for *B. cereus,* 10 mm for *S. aureus,* 9 mm for *E. coli* and *E. aerogenes*. The methanol extract showed inhibitory activity against all bacteria in the disc diffusion assay. The inhibition zone diameters of methanol extract were 8 mm for *S. aureus*, 9 mm for *E. aeruginosa*, 10 mm for *E. coli* and 15 mm for *B. cereus*. The MIC values of methanol extract were 8 mg/mL for *E. coli* and *S. aureus.*

**Keywords :** *Prunus laurocerasus* L., antibacterial activity, extract

## INTRODUCTION

*Prunus laurocerasus* L. (cherry laurel) is a species in the genus *Prunus*, native to regions bordering the Black Sea in Southwestern Asia and Southwestern Europe. *P. laurocerasus* has been widely planted as an ornamental plant in temperate regions worldwide because it is a very decorative and popular tree. Cherry laurel is mainly distributed on the coast of the Black Sea region of Turkey. This species is also well known as a traditional medicine used for digestive system complaints, bronchitis, eczemas and as a diuretic agent (Sulusoglu and Cavusoglu, 2013). Cherry laurel is consumed fresh or dried, in jam and marmalade, canned or pickled. Cherry laurel is used for food additives such as flavoring (Leung and Foster, 1996). The leaves and seed of this species are used in pharmaceuticals. The tree is also valuable for ornamentation as an evergreen broad leaf plant (Islam and Bostan 1996). It is easily propagated by cuttings (Ansin and Ozkan, 1993). Cherry laurel, as a table cultivar, is one of the important varieties grown in Trabzon province of Turkey. There were very few reports of *P. laurocerasus* in the literature.This prompted us to investigate the antibacterial activity of *P. laurocerasus* fruit extracts.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

*P. laurocerasus* fruits (500 g) were purchased from the local herbal shop, Artvin-Turkey.

### Extraction

*P. laurocerasus* dried fruits were macerated with three different solvents from the lowest polarity level to highest. These were hexane, ethyl acetate, and methanol in order. Samples were dissolved in solvents for a day and this application repeated 3 times for every solvent. After consisting of 3 extracts and solvent mixing was collected to a storage bottle. In this process, products were protected light and high temperatures. After that, products were decomposed from the solvent by using rotary evaporation by using boiling point differences. Pure extracts were obtained and dried for the antibacterial assay.



**Figure 1.** Filtration of extract



**Figure 2.** Decomposition of solvent

**Antibacterial Assay**

Antibacterial activity of extracts was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 by using broth microdilution and disc diffusion methods. Bacteria were integrating into 5 mL nutrient broth and Mc Farland set 0.5. Each extract was prepared in such a way that the final concentration would be 16 mg with %10 DMSO and extracts was sterilized through the 0.45 µm pore size filter.

**Microdilution Assay**

In order to determine MIC, the broth microdilution method was used. 100 µL nutrient broth put in every well of 96 round bottoms well plate and 100 µl of each extract is put in only first well. 100 µL is taken from the first and it is transferred to others through serial dilution. 10 ml of bacterial suspension were added to each well in order (Figure 4). For positive control, chloramphenicol was used. All process was done duplicated. The microplate waited in the incubator at 37°C for 24 hours.

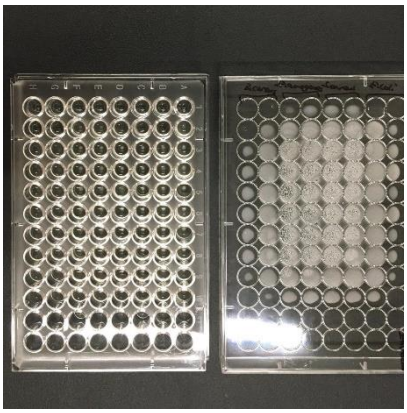


**Figure 3.** Broth microdilution test results

**Disk-diffusion Method**

Bacteria were planted in nutrient agar medium from 100 µl of bacterial suspension by using spread plate culture technique. Antibiotic discs (Whatman papers) which were 6 mm in diameter were placed on 10 µl of extracts (1 g/mL) to provide the experiment concentration of 10 mg/disc surfaces by means of sterile forceps, 3 in each medium. 10 µl of physiological saline (for a negative control) and 10 µl of chloramphenicol antibiotics were absorbed in the other disc (for positive control). This process was applied for 2 times. All plates were incubated in an incubator at 37°C for 24 hours.



**Figure 4.** Preparation of disc diffusion method

## RESULTS

Hexane extract did not show inhibitory activity against all bacteria in both assays. The ethyl acetate extract showed inhibitory activity against test microorganisms in both assays. The MIC values of ethyl acetate extract were 4 mg/mL for *S. aureus* and 8 mg/mL for *E. aerogenes*, *B. cereus* and *E. coli* (Table 1). And the inhibition zone diameters of ethyl acetate extract were 18 mm for *B. cereus*, 10 mm for *S. aureus*, 9 mm for *E. coli* and *E. aerogenes* at 10 mg/disc (Table 2). The methanol extract showed inhibitory activity against all bacteria in the disc diffusion assay. The zone diameters of methanol extract were 15 mm for *B. cereus*, 10 mm for *E. coli*, 9 mm for *E. aeruginosa*, and 8 mm for *S. aureus* at 10 mg/mL (Table 2). The MIC values of methanol extract were 8 mg/mL for *E. coli* and *S. aureus* (Table 1).

**Table 1.** The results of broth microdilution assay

| Extract | Gram-negative bacteria | | Gram-positive bacteria | |
|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* | *E. aerogenes* | *S. aureus* | *B. cereus* |
| Hexane | Not effective | Not effective | Not effective | Not effective |
| Ethyl acetate | 8 mg/mL | 8 mg/mL | 4 mg/mL | 8 mg/mL |
| Methanol | 8 mg/mL | Not effective | 8 mg/mL | Not effective |

**Table 2.** The results of disc diffusion assay

| Extract | Gram-negative bacteria | | Gram-positive bacteria | |
|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* | *E. aerogenes* | *S. aureus* | *B. cereus* |
| Hexane | Not effective | Not effective | Not effective | Not effective |
| Ethyl acetate | 9 mm | 9 mm | 10 mm | 18 mm |
| Methanol | 10 mm | 9 mm | 8 mm | 15 mm |

## DISCUSSION

The antibacterial activity of ethanol extract of leaves *P. laurocerasus* was determined against 12 microorganism (*E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* vulgaris, *B. cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces fragilis*, *Rhodotorula rubra*). The ethanol extract did not show activity tested microorganisms (Bulger and Gonuz, 2004). In the current study, ethyl acetate and methanol extracts showed activity against *E.* coli, *S. aureus* and *B. cereus*. These differences in antimicrobial activities of *P. laurocerasus* can be related to geographical regions, extraction methods and chemical composition.

## CONCLUSION

The methanol and ethyl acetate extracts of cherry laurel fruits showed antibacterial activity against test microorganisms. Further studies on extracts of *P. laurocerasus* are required to improve the extraction procedure and to isolate active compounds of extracts that are responsible for its antibacterial activities. The

hexane extract did not show antibacterial activity against all bacteria. This result indicates a higher concentration of the extracts is required to inhibit the growth of bacteria.

**REFERENCES**

Ansin Z, Ozkan ZC 1993. *Prunus laurocerasus* L. In: Spermatophyta. Genel Yayin No. 167, Fakülte Yayin No: 19.512 p. Trabzon, Turkey, Karadeniz Technical University, Faculty of Forestry. (In Turkish.).

Bulger D and Gonuz A 2004. Antimicrobil Activity of Some Turkish Medicinal Plants. Pakistam Journal of Biological Sciences, 7(9):1559-1562.

Islam A, Bostan SZ 1996. A promising fruit species: cherry laurel. Journal of Agriculture Engineering 291:21.

Leung AY, Foster S 1996. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics, Second edition. John Wiley and Sons, Inc., 649.

Sulusoglu M, Cavusoglu A 2013. Micropropagation of cherry laurel *Prunus laurocerasus* L. Journal of Food, Agriculture and Environment, 11(1):576-579.

# Investigation on Hydrocarbon Degradation Ability Of Some Halophilic Microorganism Isolates

Melek Tekgöz[1]* , Mehmet Burçin Mutlu[1]

*[1]Eskişehir Teknik University, Faculty of Science, Department of General Biology
Eskişehir, Turkey.

* melekkfirat@hotmail.com

**Abstract**
This study aimed to determine the ability of 120 halophilic microorganisms isolated from different salt lakes and salterns in our country to their potential for biodegradation hydrocarbons (phenol, pyrene, benzopyrene, naphthalene and phenanthrene). Twenty-eight isolates that capable of degrading hydrocarbons were chosen for identification with 16S rRNA sequence analysis. All of the isolates were identified as *Chromohalobacter, Idiomarina, Marinobacter, Aquisalimonas, Halomonas, Virgibacillus ve Halovibrio* in Bacteria domain. Gas chromatography-mass spectroscopy analysis carried out with three representative strains confirmed their ability to efficiently degrade aromatic compounds under halophilic conditions. As a result of analysis, *Chromohalobacter salexigens, Marinococcus halophilus* and *Halomonas sp.* were able to use all hydrocarbons as the sole carbon and energy source. Results that gathered in this study demonstrate twenty-eight halophilic bacterial strains have noticeable potential for further use in bioremediation processes in hydrocarbons contaminated hypersaline enviroments.
**Keywords:** Halophilic microorganism, Hydrocarbon, Degradation, 16S rRNA sequence analysis

## INTRODUCTION

In recent years, with an increasing awareness about the potential negative effects of pollutants on public health and the environment, remediation and renovation of the environment contaminated with hazardous substances have become increasingly attention. Some aromatic hydrocarbons are well known as, mutagens carcinogens, and toxic compounds and therefore pose a serious threat to the health (Gibbs, 1997; Cao et al., 2009). Aromatic hydrocarbons have a ubiquitous distribution in nature and are formed through the pyrolysis and incomplete combustion of organic matters, like industrial activities, forest fires, traffic and home heating (Manahan, 2009; Johansson and van Bavel, 2003). The physicochemical properties of aromatic hydrocarbons, makes them highly mobile in the environment, allowing them to distribute across soil, air, and water where their presence is ubiquitous (Ravindra et al., 2008). Hypersaline environments are often contaminated by aromatic compounds that result from industrial activities. Morever hypersaline waste water is generated as a result of many industrial activities such as wastes from mining, natural gas production facilities, mining and chemical production. Therefore, the use of halophilic microorganisms are great importance in the biological treatment of hypersaline environments and hypersaline waste water (Oren et al., 1992). This study aimed to determine the ability of 120 halophilic microorganisms isolated from different salt lakes and salterns in our country to their potential for biodegradation hydrocarbons (phenol, pyrene, benzopyrene, naphthalene and phenanthrene) under halophilic conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Sources of microorganisms

The 120 isolates used in the study were collected from different salt lakes and salterns in Turkey to their potential for biodegradation hydrocarbons (phenol, pyrene, benzopyrene, naphthalene and phenanthrene).

### 2.Screening of microbial growth on aromatic hydrocarbons

Isolates were pre-cultured in microplates containing 150 µL R2A broth and incubated for 24 hours at 30 °C and 150 rpm in a rotary shaker. Naphthalene, pyrene and phenanthrene (0.01 mg/mL); phenol (0.02 mg/mL) were dissolved in hexane and dimethylformamide was used to dissolved benzopyrene (0,005 mg/mL) to evaluate the ability of bacteria to grow using them as sole carbon source. In most cases 20 µL of a aromatic hydrocarbon solution was added to each microtiter plate well and hexane was evaporated in a sterile flow cabinet, which resulted in a coat of aromatic hydrocarbon crystals on the well walls. 150 µL of BH broth was added to each wells.10 µL of the bacterial cultures were transferred to microplate containing 150 µL BH medium incubated in a rotational shaker at 30 °C and 150 rpm for 48h (Johnsen et al., 2002). After 48 h of

incubation, 30 µL MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide] solution (1 mg/mL) were added to each well to assess microbial respiration and consumption of hydrocarbons as sole carbon source. After 1 h of incubation at 30 °C, cellular activity was shown in the purple color of the culture medium (Bicalho et al., 2003).

**3. GC-MS analysis of aromatic hydrocarbon biodegradation**

Three isolates with positive growth using different aromatic hydrocarbons were pre-cultured in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of R2A medium added of 12% NaCl and incubated at 30 °C, 150 rpm for 12 h for GC-MS analysis. Spectrometry reading (600 nm) was evaluated every 3 h (Cerqueira et al., 2011). 4 mL of the bacterial growth were inoculated to a final concentration of 4 $x10^6$ CFU/mL in Erlenmeyer flasks containing 45 mL of BH medium added of 12% NaCl. As the carbon source, hydrocarbons were added all together, as a cocktail, in the initial concentrations of 0.1 mg/mL naphthalene, phenanthrene and pyrene, 0.2 mg/mL phenol, and 0.05 mg/mL benzopyrene to a final volume of 50 mL. Assays were performed in dublicate and monitored for 10 days using GC-MS. Samples were taken different days, totaling 4 sampling times (time zero, 1, 5 and 10th day) for each isolate examined. Samples extracted with dichloromethane (2 mL) solution which was used as internal standard. GC-MS analyzes were performed (Passarini et al., 2011).

**4. Microbial identification**

Twenty-eight isolates that capable of degrading hydrocarbons were chosen for identification with 16S rRNA sequence analysis. Broad-range PCR primers specific for Bacteria and Archaea were used in these reactions; 21f (5′-TTCC GGTTGATCCTGCCGGA-3′) specific for the Archaea domain and 27f (5′-AGAGTTTGATCATGG CTCAG-3′) specific for the Bacteria domain were used as forward primers, while 1492r (5′-GGTT ACCTTGTTACGACTT-3′) was used as the reverse primer for Bacteria and Archaea (Lane et al., 1985). Amplification was conducted using an Techne (Tc-5000) Thermal Cycler and the program consisted of 1 cycle for denaturation at 95 $^0$C, for 2 min, followed by 30 cycles of 30 sec at 94 $^0$C, for denaturation, 1 min at 50 $^0$C, for annealing, and 2 min at 72 $^0$C. for extension, with a final extension step of 10 min at 72 $^0$C. PCR products were analyzed using agarose gel electrophoresis (1 % agarose gels) and isolates were classified as either Bacteria or Archaea. 16S rDNA sequences of closely related taxa of isolates were retrieved from the NCBI database by using basic local alignment search tool.

**RESULTS and DISCUSSION**

Twenty-eight isolates that capable of degrading aromatic hydrocarbons were identified from 120 halophilic microorganisms isolated from different salt lakes and salterns in Turkey. Twenty-eight isolates that capable of degrading hydrocarbons were chosen for identification with 16S rRNA sequence analysis. All of the isolates were identified as *Chromohalobacter, Idiomarina, Marinobacter, Aquisalimonas, Halomonas, Virgibacillus ve Halovibrio* in Bacteria domain. Microorganism were degraded well in phenol, naphtalene and phenantrene that have lower molecular weights than piren and benzopyrene. As a result of the study, isolates developed optimally at 37 °C and pH 7.5 in the medium containing 12% and 18% NaCI. Gas chromatography-mass spectroscopy analysis carried out with three representative strains confirmed their ability to efficiently degrade aromatic compounds under halophilic conditions. As a result of analysis, *Chromohalobacter salexigens, Marinococcus halophilus* and *Halomonas sp.* were able to use all hydrocarbons as the sole carbon and energy source. The results obtained from GC-MS analysis confirmed that some of the bacterial strains were able to efficiently degrade aromatic compounds under halophilic conditions, yielding various secondary metabolites, such as dodecane, tetradecane, hexadecanen, p-xileno, o-xileno, antracene. Results that gathered in this study demonstrate twenty-eight halophilic bacterial strains have noticeable potential for further use in bioremediation processes in hydrocarbons contaminated hypersaline enviroments.

**REFERENCES**

Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. of Bacteriology*, *41*(5), 653.

Cao, B., Nagarajan, K., & Loh, K. C. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl. Microbiology and Biotechnol.*, 85(2), 207-228.

Cerqueira, V. S., Hollenbach, E. B., Maboni, F., Vainstein, M. H., Camargo, F. A., Maria do Carmo, R. P., & Bento, F. M. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource tech.*, *102*(23), 11003-11010.

De Vasconcellos, S. P., Angolini, C. F. F., García, I. N. S., Dellagnezze, B. M., Da Silva, C. C., Marsaioli, A. J., ... & De Oliveira, V. M. (2010). Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Org. Geochem. 41*(7), 675-681.

Gibbs, G. W. (1997). Estimating residential polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) related lung cancer risks using occupational data. *Ann. Occup. Hyg.*, 41(inhaled_particles_VIII), 49-53.

Johansson, I., & Van Bavel, B. (2003). Levels and patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons in incineration ashes. *Sci. of the Total Environ.*, 311(1-3), 221-231.

Johnsen, A. R., Bendixen, K., & Karlson, U. (2002). Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(6), 2683-2689.

Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 1985; 82:6955-6959.

Manahan, S. (2017). *Environmental chemistry*. CRC press.

Oren, A., Gurevich, P., Azachi, M., & Henis, Y. (1992). Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation*, *3*(2-3), 387-398.

Passarini, M. R., Sette, L. D., & Rodrigues, M. V. (2011). Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown in fermentative medium. *J. of the Braz. Chem. Soc.*, *22*(3), 564-570.

Ravindra, K., Sokhi, R., & Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.*, 42(13), 2895-2921.

# Toryum elementi ve kimyasal özellikleri

Enes SARIKAHYA[1*], Derya PEKER[1], Emel ALĞIN[2]

[*1]Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik, Eskişehir, Türkiye
[2]Adana Alparslan Türkeş BTÜ, Mühendislik Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği, Adana, Türkiye

*enessarikahya@gmail.com

## Özet
Toryum, periyodik tablonun IV-B grubunda bulunur. Aktinitler element serisinde bulunan toryum, radyoaktif bir elementtir. Toryumun kimyasal özellikleri hafniyum, titanyum ve zirkonyum elementlerine çok benzediğinden dolayı bu elementlerle birlikte periyodik tablonun IV-B grubunda bulunmaktadır. Toryum suda çözünmez, HCl ve $H_2SO_4$'te çözünür. Suda çözünebilen toryum bileşikleri nitrat, klorit, sülfat ve florit tuzları içermektedir. Toryum, iyodür, florür, fosfat vs. iyonlarıyla asitlerde çok az çözünen veya hiç çözünmeyen bileşikler oluşturur. Bu bileşikler, toryumun diğer elementlerden ayrılmasında ve analizinde kolaylık sağlar.
**Anahtar Kelimeler:** Toryum, bileşikler, nükleer, reaktörler, fiziksel, kimyasal, özellikleri, ayrıştırma, kullanımı

# Thorium element and chemical properties

## Abstract
Thorium is in the IV-B group of the periodic table. Thorium is a radioactive element which in element series of the actinides. Due to chemical properties of thorium are very similar to hafnium, titanium, zirconium elements, they are associated in the IV-B group of the periodic table. Thorium is not dissolved in the water, is dissolved in HCl, $H_2SO_4$. Water soluble of thorium compounds include nitrate, chlorite, sulfate and fluorite salts. Thorium forms compounds that dissolve little or no dissolve in acids with ions like iodide, fluoride, phosphate etc. These compounds facilitate the separation and analysis of thorium from other elements.
**Keywords:** Thorium, compounds, nuclear, reactors, physical, chemical, properties, separation, application

## Giriş
1975 yılında dünya nüfusunun 3,7 milyar olduğu ve 2018 yılı olarak ise 7,6 milyara ulaşmış bulunmaktadır. Kişi başına tüketilen enerji miktarı ise 1975 yılında 2kw/kişi, 2050 yılında ise 3,5kw/kişi olacağı öngörülmektedir.
Son birkaç yüzyıldan önce dünyanın başlıca enerji kaynağı olan odunun yerine 1800'lü yıllarda kömür daha sonra ise 1900'lü yıllarda ise petrol önemli enerji kaynağı olarak öne çıkmıştır.
Dünyanın kömür rezervlerinin %39'u Rusya ve Çin'de, petrol rezervlerinin %75 kadarı Orta Doğu ve Kuzey Afrika, doğalgaz rezervlerinin ise %30 kadar Rusya topraklarında bulunmaktadır. Kömür rezervlerinin yaklaşık 400 yıl, petrol rezervlerinin 45 yıl, doğalgaz rezervlerinin 150 yıl içinde tükenmesi öngörülmektedir. Bu durum dünyanın yeni enerji kaynaklarına başvurmadan enerji talebini karşılayamayacağını göstermektedir. Bunun sonucu olarak kömür yeniden önem kazanmaya başlamış, nükleer enerji ise yeni bir enerji kaynağı olarak gelişmeye başlamıştır [2][9].
Nükleer enerji olarak toryum, geleceğin enerji kaynaklarından biri olarak görülmektedir. Bugünün nükleer santrallerine güç veren uranyum ile karşılaştırıldığında toryum; yeryüzünde daha bol ve geniş bir alana yayılmıştır. Geleceği heyecanla beklenen bir nükleer yakıt konumundaki toryum, kritik element olarak varlığını sürdürmektedir [8].

## Toryum
Toryum (Th), periyodik tablonun aktinitler serisindeki atom numarası 90 olan radyoaktif kimyasal elementi kullanışlı bir nükleer reaktör yakıtıdır. Toryum İsveçli kimyager Jöns Jacob Berzelius tarafından 1828 yılında keşfedilmiştir. Toryum kimyada 'Th' sembolü ile anılmaktadır. "Toryum" kelimesi, mitolojik İskandinav efsanelerinde adı geçen şimşek tanrısı Thor'dan gelen bir kelimedir. Gümüşi beyazdır, ancak havaya maruz kaldığında gri veya siyaha döner. Yer kabuğunda uranyuma göre üç kat daha fazla bulunmaktadır. Ticari olarak monazit mineralinden olduğu gibi torit ve toryanit gibi minarellerden de çıkarılmaktadır. Toryum metali tetraflorit ($ThF_4$) ve dioksite ($ThO_2$) indirgenmesi ile ve tetraklorit ($ThCl_4$) elektrolizi ile ticari miktarlarda üretilir [3].

Toryum metali, haddeleme, dövme gibi yöntemlerle imal edilebilir, fakat çekme kuvveti düşüklüğünden dolayı çekme yöntemi ile imalatı zordur. Çekme kuvveti ve kaynama noktası gibi özellikleri, karbon ve toryum dioksit gibi küçük miktarlardaki safsızlık değerlerinden kolayca etkilenmektedir. Magnezyum ve magnezyum alaşımlarına eklenerek yüksek sıcaklık mukavemeti geliştirilir. Işığın 2000-3750 angström arası dalga boylarının ultraviyole ışığı ölçümü için ticari fotoelektrik hücrelerde kullanılır. Toryum cama eklenerek, özel optik uygulamaları için kullanışlı olan yüksek kırma indeksi sağlar. Eskiden gaz ve gazyağı lambaları için fitillerin bir bileşeni olarak büyük talep görüyordu ve ampuller ve vakum tüpleri için tungsten filamentlerin üretiminde kullanılmıştır.
Toryum radyoaktivitesi, 1898 yılında Alman kimyager Gerhard Carl Schmidt ve Fransız fizikçi Marie Curie tarafından bulunmuştur. Doğal toryum, 14 milyar yıllık yarı ömrü ile çok uzun ömürlü toryum-232 radyoaktif izotopları karışımından oluşmaktadır. Diğer izotopları doğal uranyum ve aktinyum serilerinde bulunmaktadır ve toryum tüm uranyum madenlerinde mevcuttur. Toryum-232 üretken reaktörler için kullanışlıdır, çünkü yavaş nötronları yakalayarak fisil uranyum-233 izotopları hazırlanır.
Toryum nerdeyse tüm bileşiklerinde bir +4 oksidasyon durumu gösterir. Th4+ iyonu pek çok kompleks iyonu şekillendirir. Dioksit ($ThO_2$) çok dayanıklı bir madde olup pek çok endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Toryum nitrat ticari bir tuz olarak kullanışlıdır.

**Tablo 1.** Toryumun Özellikleri [5].

| **Genel Özellikler** | | **Sınıflandırması** | |
|---|---|---|---|
| Sembol | Th | Blok | F |
| Atom Numarası | 90 | Grup | 2 |
| Atom Kütlesi | 232.0377 | Periyot | 7 |
| Yoğunluk | 11.724 g/cm$^3$ | Seri | Aktinitler |
| Erime Noktası | 1750 °C | Elektron Konfigürasyonu | [Rn]7s26d2 |
| Kaynama Noktası | 4820 °C | Renk | Gümüş |
| Madde Hali | Katı | Cas Numarası | CAS7440-29-1 |
| Termal İletkenlik | 54 W/(m K) | | |

**Toryum İşlenmesi**
Toryum işlemesi, cevherin çeşitli ürünüler şeklinde kullanımına hazırlanmasıdır. Toryum 11.7g/cm3 yoğunluklu demirden yumuşak gümüşi metaldir. Ergime noktası yaklaşık 1750 °C'dir. 1360 °C altında metal yüzey merkezli kübik kristal formunda, ergime noktasına kadar sıcaklıklarda ise gövde merkezli kübik kristal formundadır. İnce bölünmüş toryum metali hava ortamında yanabilir; fakat büyük kütleli durumda, normal sıcaklık koşullarında yüzeyinin uzunca oksijen ile reaksiyonu sebebiyle kararmasına rağmen hava ortamında stabil durabilir. Reaktivitesinden dolayı mineralinden zorlukla çıkartılır [4].
Neredeyse tüm toryum, doğal toryum-232 izotopu şeklinde bulunur. Bu nispeten düşük radyoaktif metal kendi kendine fisil değildir. Fakat nükleer reaktörler içerisinde fisil uranyum-233'e dönüştürülebilir. Yer kabuğunda uranyumdan yaklaşık üç kat miktarda bulunan toryum bulunduğundan beri üretken yapısı ile neredeyse sınırsız nükleer enerji kaynağını temsil eder. Bu teorik değeri gerçekleştirmek için, maliyetli çıkartma ve dönüştürme tekniklerinin üstesinden gelinmek zorundadır.

**Cevher**
Esas ticari toryum kaynağı monazittir ve $(Ce,La,Nd,Th)PO_4$ kimyasal formülü ile kuru nadir toprak fosfatıdır. Genellikle %3 ila %5 metal içeriği bulunan monazit, toryum dioksit $ThO_2$ formundaki toryumdur. Toryum metali ve bileşikleri için dünyadaki şimdiki talebin çoğu Hindistal Malabar sahilleri boyundaki dalgaların çökelttiği, kabaca sarı-kahverengi kumlardan oluşan monazitten oluşan alüvyonların madenciliği ile karşılanmaktadır. Diğer toryum cevherleri oksit minerali olan toriyanit ($ThO_2$) ve silikat mineral torit ($ThSiO_4$) ticari olarak çıkartılmamaktadır.

**Tablo 2**. Dünya'daki Toryumun Ülkelere Göre Dağılımı [6].

| **Ülke** | **Ton** |
|---|---|
| Hindistan | 846,000 |
| Brezilya | 632,000 |
| Avustralya | 595,000 |
| ABD | 595,000 |
| Mısır | 380,000 |
| Türkiye | 374,000 |
| Venezüella | 300,000 |
| Kanada | 172,000 |
| Rusya | 155,000 |
| Güney Afrika | 148,000 |
| Çin | 100,000 |
| Norveç | 87,000 |
| Grönland | 86,000 |
| Finlandiya | 60,000 |
| İsveç | 50,000 |
| Kazakistan | 50,000 |
| Diğer | 1,725,000 |
| **Toplam** | **6,355,000** |

**Çıkartma ve Arıtma**

**Asit ve alkali ile parçalama:** Monazitin kimyasal olarak çok stabil olmasına rağmen sülfürik asit gibi hem güçlü mineral asitleri, hem de sodyum hidroksit gibi alkalilerin etkilerine karşı duyarlıdır. Asit işleminde iyi bir biçimde yerleştirilmiş monazit kumu 155 °C ila 230 °C sıcaklıklarında %93 gibi yüksek yoğunluklu $H_2SO_4$ ile parçalanır. Bu monaziti hem fosfat hem de metal içeriğini suda çözünebilir parçalara dönüştürür. Bu çözelti sulu amonyak ile buluşur, ilk sulandırılmış jelatin kıvamındaki toryum fosfat çökelmesi, sonra da toryum fosfattan toryum hidroksite dönüşür. Ham toryum hidroksit, çözücü ekstraksiyonu ile nihai saflaştırma için uygun bir toryum nitrat içeren belseme çözeltisi oluşturmak için nitrik asit içerisinde çözünür.

Alkali parçalama, iyice öğütülmüş monazit kumu 138 °C sıcaklıkta konsantre sodyum hidroksit çözeltisi ile katı hidroksit ürün elde etmek için dikkatli bir şekilde işlenir. Daha sonra bu katı tortuyu çözmek için birkaç mineral asitten herhangi biri kullanılır. Örneğin, hidroklorik asit ile işleme, bir toryum ve nadir toprak klotrit çözeltisi verir. Geleneksel olarak toryum, asidik klorür çözeltisine sodyum hidroksit ilavesiyle nadir topraklardan kısmen ayrılır. Ham toryum hidroksit çökeltisi daha sonra çözücü ekstraksiyonu ile nihai saflaştırma için nitrik asit içinde çözülür.

**Çözücü Ekstrasiyonu:** Toryumun artık nadir bulunan topraklardan ve nitrik asit besleme çözeltilerinde bulunan diğer kirleticilerden saflaştırılması için ham toryum nitrat konsantratı genellikle uygun bir hidrokarbonla seyreltilmiş bir tributil fosfat çözeltisi ile buluşturulur. Toryum içeren nihai organik ekstrakt daha sonra kirletici olan nadir toprakları ve diğer metalik safsızlıkları kabul edilebilir seviyelere çıkarmak için az miktarda nitrik asit çözeltisi ile aksi yönde buluşturulur. Son olarak, temizlenmiş tributil fosfat çözeltisi seyreltilmiş bir nitrik asit çözeltisi ile buluşturulur, bu, organik fazda mevcutsa uranyum tutarken toryumu organik çözücüden sulu çözeltiye çıkarır veya dilimler. Saflaştırılmış toryum nitrat çözeltisinin termal yoğunluğu, gaz fitili üretimi için uygun bir ürün verir. Nitrat ayrıca nükleer reaktörler için seramik yakıt elemanlarına dâhil edilen veya toryum metaline dönüştürülen $ThO_2$'e de indirgenebilir.




**Şekil 1.** Monazit, Toriyanit, Torit [5].

**Metale İndirgeme:** Toz haline getirilmiş $ThO_2$, toryum tetraflorür ($ThF_4$) verecek şekilde gaz halindeki hidrojen florür (HF) ile florlanabilir. Metal, toz haline getirilmiş $ThF_4$'ün ince parçalanmış kalsiyum (Ca) ve bir çinko halojenür (çinko klorür veya çinko florür) ile karıştırıldığı ve kapalı, ısıya dayanıklı kaplamalı bir bombaya yerleştirildiği 'Spedding' işlemi ile elde edilir. Yaklaşık 650 °C'ye kadar ısıtıldığında, toryumu ve çinkolu metale indirgeyen ve cüruf kalsiyum klorür veya kalsiyum florür üreten bir ekzotermik reaksiyon oluşur:

$$ThF_4+3CaZnCl_2 \xrightarrow{(1)} Th+Zn+2CaF_2+CaCl_2$$

$$ThF_4+3Ca+ZnF_2 \xrightarrow{(2)} Th+Zn+3CaF_2$$

Katılaştırmadan sonra çinko-toryum alaşımı ürünü çinkonun kaynama noktasının (907 °C) üstünde, ancak toryumun erime sıcaklığının altında ısıtılır. Bu, çinko buharlaştırır ve eritilip külçelere dökülen yüksek derecede saflaştırılmış bir toryum süngeri bırakır.

**Kimyasal Bileşikleri**

**Toryum Nitrat:** Toryum cevherleri işlendiğinde yüksek derecede saflaştırılmış toryum nitrat, $Th(NO_3)_4$'ün sulu çözeltileri üretilir. Nitrat, gaz fitillerinin ticari üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür fitiller, pamuk veya sentetik elyafların her biri toryum sülfat ve cömert nitratın yüzde 0,5 ila 1'ini içeren yüzde 25 ila 50'lik bir $Th(NO_3)_4$ çözeltisi emdirilmesi ile yapılır. Emdirilmiş lifler toryum hidroksit, $Th(OH)_4$ üreterek sulu amonyak ile işlenir ve bu bileşik $ThO_2$ üretmek için indirgenir. İkinci madde, ısıtıldığında parlak beyaz ışık yayar. Eklenen nitrat, spektral emisyon özelliklerini geliştirirken, az miktarda toryum sülfat verimi, geliştirilmiş mekanik özelliklere sahip lifler sağlar.

**Toryum Dioksit:** Herhangi bir endüstriyel öneme sahip diğer toryum bileşiği, torya olarak bilinen $ThO_2$'dir. Nükleer uygulamalar için, torya iyice saflaştırılmış $Th(NO_3)_4$'ün indirgenmesi ile hazırlanır. Torya ayrıca çeşitli yüksek sıcaklık işlemlerinde ısıya dayanıklı malzeme olarak bazı uygulamalar bulur.

**Toryumun Kullanımı**

Mevcutta Toryum savaş uçakları motorları, füzeler, uzay araçları, yüksek çözünürlüklü kamera mercekleri, yüksek ısıya dayanıklı potalar, elektronik cihazlar, filaman kaplamaları, yüksek sıcaklık alaşımları, lüks lamba gömlekleri, bilimsel alet mercekleri ve pek çok kimyasal işlem gerektiren alanlarda kullanılabilmektedir. Ancak toryum doğada saf halde olmadığından diğer maddelerden ayrıştırma ve fizibilite açısından pahalı olduğundan henüz tam olarak faydalanılamamaktadır [7].

Toryum, radyoaktif bir element olarak aynı zamanda önemli bir atom enerjisi kaynağıdır. Nükleer reaktörler için uranyuma oranla temiz bir kaynaktır. Yakıt döngüsünde uranyumdan daha az plütonyum ve trans uranyum elementleri sağlar. Bu doğrultuda geleceğin nükleer yakıt kaynağı olarak bilimsel çevrelerde kabul edilmektedir. Ancak yine de şimdilik Toryum ile çalışan ticari ve ekonomik ölçekli nükleer tesis bulunmuyor.

**Sonuç**

Dünya nüfusunun artması ile beraber artan enerji ihtiyacı, fosil yakıtların daha az kullanılarak atmosfere $CO_2$ salınmasının azaltılması ve yenilenebilir enerjilerin artacak elektrik talebini karşılayamayacağı durumlar dikkate alınırsa, güvenli nükleer santrallere olan gereksinimin ile beraber toryum yakıtlı nükleer reaktörlerin

geliştirilerek geleceğin reaktörleri olacağı düşünülmektedir. Geliştirilen toryum reaktörlerinden ergimiş tuz reaktörlerinin ana zorluklardan birisinin ise üretici kimyasal işlemleri olduğu bilinmektedir [1][6].

**Kaynaklar**

1. Atakan Y, Toryum Reaktörleriyle İlgili Dünyadaki ve Türkiye'deki Durum, https://www.fmo.org.tr/wp-content/uploads/2018/04/Toryum-NGS-OCAK-2018-Atakan-14-Ocak-2018.pdf [10.03.20]
2. Aybers,N.,Bayüklen,A., 1990, İTÜ Matbaası, Nükleer Reaktör Mühendisliği 1
3. Morss L, Thorium, https://www.britannica.com/science/thorium [10.03.20]
4. Schulz WW, Thorium processing, https://www.britannica.com/technology/thorium-processing [10.03.20]
5. Technical data for Thorium, https://periodictable.com/Elements/090/index.html [10.03.20]
6. Thorium, https://www.world-nuclear.org/information-library/current-and-future-generation/thorium.aspx [10.03.20]
7. Toryum Nedir? Nerelerde Kullanılır?, https://www.enerjiportali.com/toryum-nedir-nerelerde-kullanilir/ [10.03.20]
8. Toryum, https://www.enerjisistemlerimuhendisligi.com/toryum.html [10.03.20]
9. Worldometers, http://www.worldometers.info/tr/ [01.03.18]

# Çevremizde kullanılan nano teknolojik ürünler

Enes SARIKAHYA*, Derya PEKER, Mehmet PEKER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik, Eskişehir, Türkiye

*enessarikahya@gmail.com

## Özet

Nano teknoloji, maddeleri atomik düzeyde inceleyen bir mühendislik alanıdır. Nano teknoloji**,** yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılması, çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, oluşturulması ve manipüle edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Nanometre, metrenin milyarda biridir ve maddeler üzerinde çok daha esnek işlemler yapılmasına izin vermektedir.

Nano teknoloji, birçok bilim dalında kullanılabilmektedir. Her bilim, kendi dalında küçük moleküler yapılar ile muhakkak uğraşır. Nano teknoloji; günümüzde bilgisayar teknolojileri, bilimsel çalışmalar, elektrik-elektronik, kimya, biyoloji ve elbette fizikte yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu da nano teknolojinin, doğal olarak tüm bilimsel alanlarda kullanım alanı olduğunu gösterir. Günümüzde nano malzemeler ile üretilmiş çok sayıda ürün kullanılmaktadır. Sayılabilecek birçok ürün nanoteknoloji sayesinde gelişmiş şekillerde üretilmektedir. Bu ürünler yapılan araştırmalar ve çalışmalar sayesinde daha da artarken, ilerleyen zamanlarda hastalıkların iyileştirilmesi için de kullanılacak ürünlerde görülebilecektir. Bu şekilde yapılan teknolojiler sayesinde; insanoğlunun erişemeyeceği bir alanda kalmayacak gibidir.

Sürekli gelişen ve yaygınlaşan bir uğraş alanı olarak nano teknolojinin; önümüzdeki yıllarda daha çok yer işgal edeceğini ön görmek mümkündür. Henüz kısıtlı olan imkanlarla varılan gelişmeler, bundan sonrasında çok daha büyük fırsatlarla birleştiğinde insanlığın geleceğinde etkili bir role oynayacaktır. Bununla birlikte, nano boyuttaki yapılarla insanlığın iletişiminin ve etkileşiminin gelişmesi, keşifler açısından da önemli bir ilerleme olacaktır. Nanoskopik seviyenin keşfi ile belki de hiç bilmediğimiz şartlara sahip bir yaşam alanını keşfedilecek ve insanlığın faydasına çok sayıda yeni gelişmeler ortaya konacaktır. Ayrıca, bu küçük ölçekteki araştırmalar, büyük ölçekteki araştırmalar için de ilham kaynağı olabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Nano Teknoloji, Kullanım Alanları, Nanoteknolojik Ürünler

# Nano technological products used in our environment

## Abstract

Nano technology is an engineering field that examines substances at an atomic level. Nano technology is defined as revealing its brand new features, processing, creating and manipulating various tools, materials and structures at the molecular level. The nanometer is one billionth of the meter and allows much more flexible operations on substances.

Nano technology can be used in many disciplines. Every science works with small molecular structures in its field. Today, nano technology is widely used in computer technologies, scientific studies, electrical-electronics, chemistry, biology and of course physics. This indicates that nano technology is naturally used in all scientific fields. Today, many products produced with nano materials are used. Many products that can be counted are produced in advanced ways thanks to nanotechnology. While these products increase further thanks to the researches and studies carried out, it will be seen in the products that will be used for the treatment of diseases in the future. Thanks to these technologies, it seems that human beings will not stay in an area that they cannot reach.

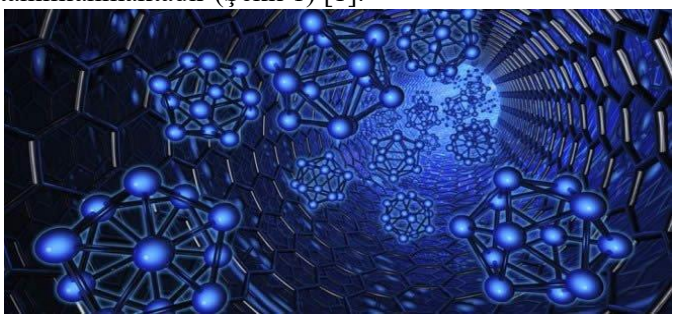
As a constantly developing and widespread field of activity, it is possible to foresee that nanotechnology will occupy more space in the coming years. Developments that have been reached with limited opportunities will play an effective role in the future of humanity when they are combined with bigger opportunities. However, the development of the communication and interaction of humanity with nanoscale structures will be an important advance in terms of discoveries. With the discovery of the nanoscopic level, a living space with conditions that we may never know will be discovered and many new developments will be introduced for the benefit of humanity. In addition, these small-scale studies can be a source of inspiration for large-scale studies.

**Keywords:** Nano Technology, Usage Areas, Nanotechnological Products

## GİRİŞ

Nano kelimesi Yunanca nannos kelimesinden gelir ve "**küçük yaşlı adam veya cüce**" demektir. Günümüzde **nano**, teknik bir ölçü birimi olarak kullanılır ve herhangi bir birimin milyarda biri anlamını taşır. Genellikle metre ile birlikte kullanılır. Nanometre, 1 metrenin milyarda biri ölçüsünde bir uzunluğu temsil eder (yaklaşık olarak art arda dizilmiş 5 ila 10 atom).

**Nano teknoloji**, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğinin yapılarak yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılması, çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, oluşturulması ve manipüle edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1) [1].



Şekil 1. Nano Teknoloji [1].

Nano teknolojinin alanı oldukça geniştir ve genişlemektedir. Nano teknoloji disiplinler arası bir alandır (Şekil 2) . Fizik, kimya, biyoloji gibi temel bilimler ile malzeme, elektronik, kimya, makine, bilgisayar mühendisliği gibi uygulamalı bilimlerin ortak alanına nano teknoloji girmektedir [2].

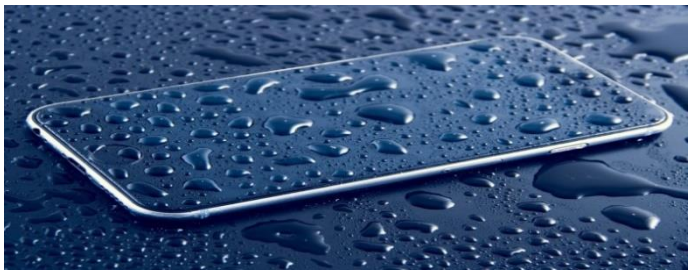



Şekil 2. Nano teknoloji disiplinler arası bir alandır [2].

Nano teknoloji, tıp alanında da oldukça çarpıcı gelişmelere imkan sağlamaya başlamıştır. Gelişmekte olan bir teknolojidir, kısıtlı sayıda uygulamaları olsa da gelecek adına çok daha geniş yelpazelere yayılacağı ortadadır. Bu teknolojiyle üretilebilecek birçok mikroskobik aygıtlar belki de damarlarımızda dolaşacak ve birer uzman gibi tedavi sağlayacaklardır. Nano boyuta sahip yapıların fiziksel özelliklerini anlaşılması ile yeni bir nanoskopik dünya ile bir köprü kurulabilecektir [2].

## NANO MALZEMELER ve ÜRETİM YÖNTEMLERİ

Nano teknoloji, gelecekte yapılması düşünülen malzeme ve aygıt üretim yöntemlerinin değişmesini, nano ölçekte işlevi olan malzeme ve aygıtların mikroskobik boyutta malzeme içine yerleştirilmesini ve bunların çok miktarda hatasız üretilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Nano ölçekte daha hafif, daha sağlam, programlanabilir malzemeler olması, daha az malzeme kullanım, üretim safhasında daha az enerji gereksinimi ve artık malzeme üretmemesi gibi avantajlar nano imalatta önemli olan hususlardır [2]. Bilgisayar, tablet, telefon ekranları; gözlükler, kamera lensleri, cam gibi yüzeylerde su ya da toz tutmayan, yansıma önleyici, kendi kendini temizleme özelliği bulunan, ultraviyole korumalı, buhardan etkilenmeyen, çizilmeye karşı dayanıklı nano teknoloji ürünü kaplamalar kullanılabiliyor (Şekil 3). Bu tür bir kullanım, sileceğe ihtiyaç duymayan araçların üretilmesini mümkün kılmaktadır [3]. Nano ölçekte elektronik devre elemanlarının üretilmesiyle bilgisayarların mimari tasarımında da değişiklikler meydana gelecektir. Nano ölçekteki devre elemanları daha az enerji ile üretildiğinden, bu bilgisayarlar daha küçük, hız ve kapasite bakımından daha büyük olacaklardır [2].



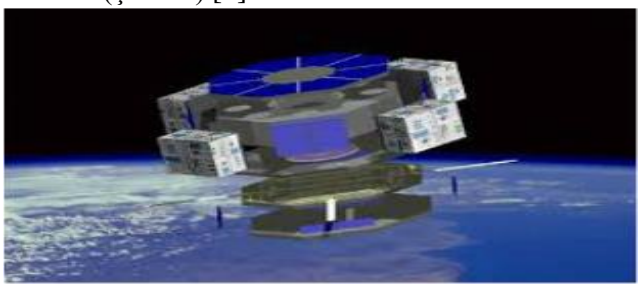
Şekil 3. Günlük yaşayışa "ufak" dokunuşlar [3].

Bu teknoloji sayesinde daha hafif arabalar, kamyonlar, trenler, gemiler, uçaklar, uzay mekikleri ve her türlü araç için yakıt tasarrufunda ciddi kazanımlar sağlanıyor. Polimer yapılı materyallere eklenen nano boyuttaki parçacıklar ile otomobil parçaları, bisikletler, bavullar, kasklar gibi ürünler; hafif, sağlam, dayanıklı ve esnek bir yapıya bürünüyor.

Nano teknoloji ile geliştirilmiş yağlar, makinelerin ömürlerini sıradan yağlara oranla önemli ölçüde artırıyor. Seramik kaplamalarda kullanılması durumunda ise bu parçaların dayanıklılığı üst seviyelere çıkıyor.

Kimyasal işlemlerde kullanılan nano teknoloji ürünleri, bu alandaki verimi yükseltmekle kalmayıp daha az materyalden daha çok üretim sağlanmasına kapı aralıyor. Bu durum, üretimde tasarruf yapılmasının yanında kimyasal reaksiyonlar sonrasında ortaya çıkan ve çevre kirliliğine neden olan unsurları da önemli ölçüde azaltıyor [3].

Nano yapılı malzemeler daha hafif, daha sağlam, sıcağa karşı daha dayanıklı olmaları sebebiyle roket ve uzay istasyonlarının yapımında önemli olmaktadır. Muhtemel uygulamalar; az enerji gerektiren, radyasyona karşı dayanıklı, yüksek verimli bilgisayarların yapımı mikroölçekteki uzay araçlarında kullanılabilecek nano ölçekte aletler, nano yapılı algılayıcılar ve nano elektronik ile desteklenen uçuş sistemleri yapımı, ısıya dayanıklı nano yapılı kaplama malzemeleri olabilir (Şekil 4) [2].



Şekil 4. Havacılık ve uzay çalışmalarında nano teknoloji **[2].**

Günümüzde medikal aletlerin üretiminde hâlihazırda kullanılan nano teknolojinin özellikle sağlık alanında çok parlak bir geleceği olduğu varsayılıyor. Görüntüleme ve tanı konusunda kullanılan cihazlarda bu teknolojinin kullanılması, erken teşhisin çok önemli olduğu hastalık türlerinde büyük avantajlar sağlıyor. Erken teşhis, hem hastanın iyileşme şansını artırması hem de hekimin tedavi seçeneklerini artırması konularında yardımcı oluyor (Şekil 5) [3].



Şekil 5. Tıp ve sağlık alanında nano teknoloji [2].

Proteinler, protein kompleksleri, dokular, kromozomlar, lipitler, karbonhidratlar, nano ölçekteki malzemelere örnek olarak gösterilebilir. Nano ölçekteki aygıtlar sayesinde hastalıkların teşhisi ve tedavisinde yeni yöntemler geliştirilecektir. Bu sayede hasar görmüş sinir hücreleri onarılabilecek, hastalıklı yapılar yok edilebilecektir [2].

Yakın bir zaman içerisinde, insanlığın temel problemleri sıralamasında 1. sırada enerji, 4. sırada çevre yer alacaktır. Nano teknolojinin, enerjinin verimli kullanılmasında, depolanmasında ve üretilmesinde uygulama alanları vardır. Nano teknolojik olarak üretilen otomobiller, daha az yakıt harcayacağı için çevreyi az kirletecek ve ekonomik olacaktır. H depolama ile hidrojen enerjisiyle çalışan otomobiller kullanılacak, sonucunda da çevre dostu yakıt tüketimi gerçekleşecektir. Ayrıca, insanlığın temel problemlerinin 2. sırasında su yer almaktadır. Nano filtreler sayesinde, temiz su elde edilmesi mümkün olabilecektir (Şekil 6) [2].



Şekil 6. Çevre ve enerji alanında nano teknoloji [3].

Özellikle endüstriyel atıkların su kirliliğine yol açtığını görüyoruz. Nanopartiküller sayesinde bu atıklar, kimyasal bir işlem sonucunda zararsız atıklara dönüştürülebiliyor. Geçmiş senelerde büyük çevre felaketlerine yol açan boru hatlarındaki arızalardan kaynaklanan petrol sızıntıları, su itici nanopartiküller ve mıknatıslar sayesinde sudan ayrıştırıldı. Özellikle deniz yaşamı için bu tür durumlara hızlı müdahale edilebilmesi, oldukça büyük önem arz ediyor.

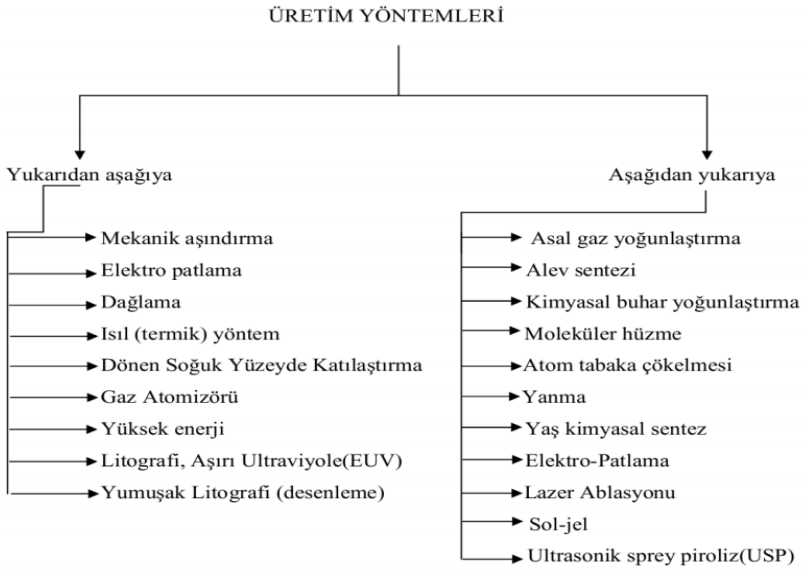
Uçaklarda kullanılmaya başlanan nanoteknoloji ile üretilmiş filtreler, havadaki zararlı parçacıkları yakalayabiliyor. Bu filtreler, ufak boyutlu gözenekleri sayesinde daha etkin bir filtreleme gerçekleştirirken bir taraftan da kötü kokuyu önlüyor.

Ulaşım, çevre, gıda üretimi gibi birçok sektörde de araştırmaları devam eden nanoteknolojinin, geleceğin şekillenmesinde ciddi katkıları olması bekleniyor [3].

Biyosentezleme ve biyoişleme yeni kimyasal ve ecza malzemeleri sağlayabilir. Biyolojik yapıtaşlarının suni malzemelerin ve aygıtların içine yerleştirilmesi ile biyolojik işlev ve başka istenen özelliklere sahip malzemeler üretilebilir. Tarımda da nano teknolojinin kullanım alanları vardır. Örneğin bitkileri böceklere karşı korumak için moleküler seviyede kimyasalların geliştirilmesi; hayvanlar ve bitkilerin genlerinin, hayvanlar için ilaçların, DNA testleri için nano ölçekte kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi sağlanabilir [2].

Nanomalzemelerde yapılmış bazı aygıtlar daha hafif ve daha sağlam, daha uzun ömürlü olabilir, nano algılayıcılar ile zararlı gazlar ve radyoaktif serpinti tespit edilebilir, nano ve mikro mekanik aygıtların birleştirilmesi ile nükleer savunma sistemleri kontrol edilebilir. Nano teknoloji ürünü tekstil malzemeleri ile akıllı giyecekler yapılabilir. Akıllı giyecekler ile 'süper asker' modeli oluşturulabilir. Askerin üzerinde giydiği akıllı üniforma; lazer silahıyla nişan aldığında haber verecek, enerjiye ihtiyacı olduğunda güneş pili gibi çalışacak, zehirli biyolojik ve kimyasal gazları tespit edebilecek ve gece karanlığında kendi askeri tarafından tanınabilecek, ama aynı zamanda çok hafif olacaktır [2].

Nano malzeme ve yapı üretilmesinde yukardan-aşağıya ve aşağıdan-yukarıya üretim olarak iki genel yaklaşım vardır. Yukardan aşağıya olarak isimlendirilen ilk yaklaşımda bütün halindeki malzeme ile işleme başlanır ve malzeme küçük parçalara ayrılır. Bu ana yaklaşımda özel işleme ve kimyasal aşındırma teknikleriyle litografi, son derece kusursuz yüzey şekillendirmeyle, mikroskobik elementlerin yapısal boyutları nanometre ölçeğine indirilir. Aşağıdan yukarıya üretim yaklaşımında ise malzeme, atomların ve moleküllerin kimyasal reaksiyonlarla boyutça büyümesi sonucu sentezlenerek elde edilir. Atomik ve moleküler elemanlar daha büyük sistemler, kümeler, organik örgüler, çok moleküllü yapılar ve sentezlenmiş makro-moleküller oluşturacak şekilde kontrollü olarak bir arada toplanması sağlanır. Şekil 7'de nano parçacıkların üretim yöntemleri verilmiştir [4].




**Şekil 7.** Nano boyutta parçacık üretiminde kullanılan başlıca yöntemler [4].

## NANO TEKNOLOJİK ÜRÜNLER

Nano teknolojik ürünler kolayca uygulanabilme özelliğine sahiptir. Silikon, bal mumu ve yağ içermez. Küf ve yosun etkileyici özelliğe sahip olan nano teknolojik ürünler antibakteriyel özelliğe sahiptir. Ultraviyole ışınlara karşı dayanıklıdır. Kaplama yapıldıktan sonra yüzey nefes almaya devam eder. Bu özelliklerden dolayı uygulamanın yapıldığı yerde harici temizlik malzemelerinin kullanımına gerek kalmaz. Bu sebeple %70–%90 deterjan ve temizleyici tasarrufu sağlar. Temizlik yapma sıklığı azalır. Malzemeden, enerjiden, zamandan tasarruf yapılmasını sağlar. Uygulama yapılan yüzey sadece su ile kolayca temizlenebilir. Laboratuar ortamında çalışmaları tamamlanmış birçok ürün bulunmaktadır. Çalışmamızda başlıca birkaç üründen bahsedeceğiz [1].

### Cam ve Seramik Kaplama

Hepimiz biliriz ki gördüğümüz ve hissettiğimiz en pürüzsüz ve düz yüzey camdır. Fakat camı mikroskop altında incelediğimiz zaman yüzeyin ay krateri gibi olduğunu görebiliriz. Cam yüzeye uygulama yapıldığında önce ürün yüzeydeki boşlukları doldurur arkasından nano piramitçikler oluşturarak yüzeyi düzler. Böylece yüzey hidrofobik (su itici) etkiye sahip olur. Yüzey su tutmadığı gibi daha parlak ve temiz görünür, daha az temizlik süresi ve daha az temizlik maliyeti ile oldukça hijenik bir görüntüye kavuşur (Şekil 8).



**Şekil 8.** Nano Teknoloji: Cam ve Seramik Kaplama [1].

### Metal Kaplama

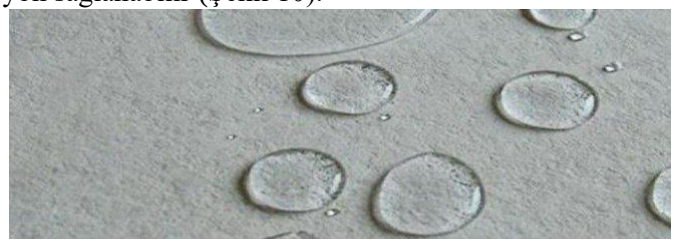
Uygulanan paslanmaz çeliğin yüzeyi kir dayanımı açısından oldukça kuvvetlenir ve yüzeyde transparan, ısıya dayanıklı, nefes alabilen uzun süreli bir koruma oluşturur. Paslanmaz çeliğin yapısının ve parlaklığının korunmasını sağlar. Parmak izlerinin azalmasını ve kolay temizlenmesini sağlar. Temizlik, deterjan gerektirmeden nemli bir bez ile veya suyla kolaylıkla yapılabilir. Temizlik yapma sıklığını azaltmasından dolayı malzeme ve zamandan tasarruf yapılmasını sağlar (Şekil 9).



**Şekil 9.** Nano Teknoloji: Metal Kaplama [1].

**Beton, Taş ve Mermer Uygulamaları**

Yüzeyin hem kir tutmasını önlemek hem de aşınmasını engellemek için kullanılır. Tatbik edilen yüzey aşınma önleyici bir kalkanla kaplanır. Çatı, zemin ve duvarlarda beton üzerine uygulanabilir. Böylelikle su sızıntıları, nem ve rutubet önlenmiş olur. Özellikle bankalar, oteller gibi lobisi sıkça insanlar tarafından ziyaret gören yerler ayakkabılar yolu ile her türlü kötü etkiye maruz kalmaktadır. Bu tip yerler sıkça temizlenerek deterjan vb. gibi malzemeler ile doğal görünümünü zamanla kaybetmektedirler. Bu gibi zeminlere uygulama yapıldıktan sonra temizliği sadece nemli paspasla yaparak ilk günkü görünümü muhafaza etmek mümkün olacaktır. Uygulama yapılmış yüzeyin boyanmasında hiçbir sakıncası yoktur. Ahşap yüzeylerde de aynı şekilde kullanılarak izolasyon sağlanabilir (Şekil 10).



**Şekil 10.** Nano Teknoloji: Beton, Taş ve Mermer Uygulamaları [1].

**Tekstil Kaplama**

Nano materyallerin üretimi ile birlikte çok daha dayanıklı ulaşım araçları ve kirlenmeyen, paslanmayan eşyalar; hatta kendi kendini temizleyen giysiler üretilebilecektir. Tüm deri ve tekstil tiplerine uygundur. Ürünlerin nefes almasını kesinlikle engellemez. Anti bakteriyel koruma sağlar, yıkama ve temizlenme kolaylığı sağlar böylelikle ürünün parlaklığı ve canlılığı korunur, tüylenmeye engel olur. Nem dengesini kusursuzlaştırır, terlemeyi engeller. Tamamen organiktir. Su ve kir itici özellik kazandırır. Örneğin; tatbik edilen yüzeylerde çay, kahve, kola, şarap vb. içecekler dahi hiç bir şekilde leke bırakmaz. Emici bir bez ile veya peçete ile yüzeyin üzerinde tanecik olarak kalan sıvı alınarak yüzeyin temizliği yapılmış olunur (Şekil 11).



**Şekil 11.** Nano Teknoloji: Tekstil Kaplama [1].

**Anti Graffiti**

Nano Anti Graffiti ürün, her türlü yüzey üzerindeki graffiti boyalarını hızlı ve iz bırakmayacak bir şekilde temizlemek üzere hazırlanmıştır. Hiç bir kimyasal içerik bulunmayan ürün, limon kabuğunda bulunan asitlerden elde edildiğinden dolayı insan sağlığına hiç bir zararı bulunmamaktadır. Otobüs duraklarında, duvarlarda, metro istasyonlarında kapılarda, köprülerde, stadyumlarda ve alt geçitlerde yaygın olarak kullanılan ürün sayesinde, graffiti kirlerini ve görsellerini, zeminin orijinal boyasına hiç bir zarar vermeyecek şekilde %100 olarak ortadan kaldırabilirsiniz (Şekil 12).



**Şekil 12.** Nano Teknoloji: Anti Graffiti [1].

**Güneş Kremleri**

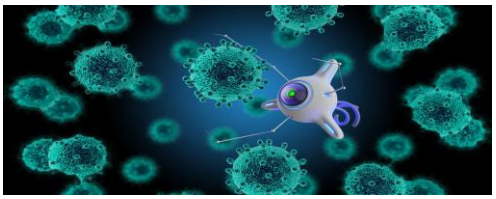
Geleneksel yüksek koruma faktörlü güneş kremlerinde ($SF_30^+$), $TiO_2$'nin mikron büyüklükteki parçacıkları ve ZnO kullanılır ve krem beyaz ve yoğun görünür. Ancak daha küçük nano boyuttaki parçacıklar kullanılırsa güneş kremi, hala UV ışınlarını yansıtırken çıplak gözle bakıldığında şeffaf halini almıştır. Bundan dolayı bu nano güneş kremi aynı yüksek koruma faktörüne sahiptir ancak artık yoğun bir beyaz madde değildir, bunun yerine şeffaf ve daha fazla seyreltilmiştir. Daha kusursuz koruma sağlayarak yüzeyde daha iyi tutunur ve eşit olarak dağılır (Şekil 13) [5].



**Şekil 13.** Nano Teknoloji: Güneş Kremleri [5].

**Nanorobotlar**

21. Yüzyıl, akıl almayacak teknolojik devrimlere gebe olan bir yüzyıldır. Nanorobot teknolojisi de bu devrimlerin yaşanacağı alanlardan birisi olarak görülmektedir. Özellikle son günlerde kanser tedavisiyle adından söz ettiren nanorobot teknolojisi, ilerleyen yıllarda büyük gelişmelerin yaşanacağının sinyallerini vermiş durumdadır. Nanorobot teknolojisinden pek çok sektörde yararlanılmaktadır. Nanorobot teknolojileri uygulamaları; tıp, askeri, sağlık, dişçilik ve çevresel uygulamalara kadar geniş bir yelpazeye sahiptir (Şekil 14) [6].



**Şekil 14.** Nano Teknoloji: Nanorobotlar [7].

**Tartışma ve Sonuç:** Sürekli gelişen ve yaygınlaşan bir uğraş alanı olarak nano teknolojinin; önümüzdeki yıllarda gündemde daha çok yer işgal edeceğini ön görmek mümkündür. Henüz kısıtlı olan imkanlarla varılan gelişmeler, bundan sonrasında çok daha büyük fırsatlarla birleştiğinde insanlığın geleceğinde etkili bir rol oynayacaktır. Bununla birlikte, nano boyuttaki yapılarla insanlığın iletişiminin ve etkileşiminin gelişmesi, keşifler açısından da önemli bir ilerleme olacaktır. Nanoskopik seviyenin keşfi ile belki de hiç bilmediğimiz şartlara sahip bir yaşam alanı keşfedilecek ve insanlığın faydasına çok sayıda yeni gelişmeler ortaya konacaktır. Ayrıca, bu küçük ölçekteki araştırmalar, büyük ölçekteki araştırmalar için de ilham kaynağı olabilecektir.

**KAYNAKLAR**

[1] https://www.myfikirler.org/nano-teknoloji-nedir-nano-teknolojik-urunler.html [24.02.20]
[2] https://ahmetakgonul.weebly.com/kullan305m-alanlar305.html [24.02.20]
[3] https://www.hepsiburada.com/kesfet/nano-teknoloji-nedir/ [08.03.20]

[4] Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part:C, Tasarım Ve Teknoloji GU J Sci Part:C 3(2):483-499 (2015).
[5] http://nanopinion.archiv.zsi.at/tr/about-nano/nanoteknoloji-ve-kozmetikler.html [12.03.20]
[6] https://www.mediaclick.com.tr/blog/nanoteknoloji-nedir [08.03.20]
[7] https://magg4.com/nanorobot-teknolojisi-saglik-sektorunde-devrim/ [15.03.20]

# Oksidatif stres biyobelirteçleri ve kotinin düzeylerinin sigara maruziyeti ile ilişkisinin incelenmesi

Fatih Hunç[1], Esra Acar[1*], Pınar Baki Ünver[1], Şule Koç[1], Ezginur Kocakır[1]

[1]Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye

Sorumlu yazar: acaresra24@gmail.com

## ÖZET
Sigaraya başlama yaşının düşmesi kişilerin daha uzun süre sigaranın etkilerine maruz kalmasına, maruziyet süresinin uzaması da gelişim çağında olan adölesanların antioksidan savunma mekanizmalarında bozulmalara neden olmaktadır. Bu çalışmada amaçlanan, sigara kullanımı açısından risk grubu olan lise öğrencilerinin biyokimya perspektifinden sigara içimi ve maruziyetini değerlendirerek farkındalığı arttırmaktır. Bu çalışma, İstanbul'da bir lisede eğitim gören 16-17 yaşları arasındaki 28 öğrenci üzerinde Aralık 2017 tarihinde gerçekleştirildi. Tüm katılımcılardan toplanan, herhangi bir koruyucu içermeyen sabahın ilk idrar örnekleri toplandı. Tam idrar tekiki (TİT) ve idrarda kreatinin tayini Kocaeli Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. İdrarda kotinin konsantrasyonları enzim bağlı immunosorbent analiz (ELISA) kiti ile AOPP, GSH ve MDA konsantrasyonları ise spektrofotometrik metodlar kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz için SPSS 20.0 programı kullanıldı, istatistiksel anlamlılık için $p<0,05$ değeri referans alındı. Sigara içmenin sadece erkek adölesanlarda GSH düzeyleri açısından oluşturduğu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,044$). Tüm araştırma örnekleminde sigara içme davranışı üzerinden yapılan istatistiksel değerlendirmede sigara içme ile biyobelirteçler açısından bir fark yaratmadığı görülmüştür. (VKİ: $p=0,189$; GSH: $p=0,133$; MDA: $p=0,074$; AOPP: $p=0,280$; Kotinin: $p=0,688$). Sigara kullanımının ergenlerin sağlığına olumsuz etkilerinin biyokimyasal veriler ile göstermeyi amaçladık. Sigara kullanımı gibi riskli davranışlara yönelik aile ve toplumsal farkındalığı arttıracak tedbirler alınmasında yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.
**Anahtar Kelimeler:** Kotinin, sigara, oksidatif stres, adölesan.

## Examination of oxidative stress biomarkers and cotinine levels and their relationship with cigarette exposure

## ABSTRACT
The decrease in the age of starting smoking causes people to exposed to the negative effects of smoking for a longer period of time. And, the prolonged exposure to smoke cause disruption in the antioxidant defense mechanisms of adolescents in the development age. The aim of this study is to raise awareness by evaluating cigarette smoking and exposure from the biochemistry perspective of high school students who are at risk of smoking. This study was carried out in December 2017 on 28 students between the ages of 16 and 17 who studied at a high school in Istanbul. First-morning urine samples collected from all participants and were performed in Kocaeli University Practice and Research Hospital Central Laboratory immediately. Kotinine consentirations was examined by enzyme-linked immunosorbent assay kit and, AOPP, GSH and, MDA consentirations was determined spectrophotometric methods. SPSS 20.0 program was used for statistical analysis, $p<0.05$ value was taken as reference for statistical significance. The difference of smoking only in male adolescents in terms of GSH levels is statistically significant ($p = 0.044$). In the entire research sample, statistical evaluation based on smoking behavior did not make a difference in terms of smoking and biomarkers. (BMI: $P = 0.189$; GSH: $p = 0.13$; MDA: $p = 0.074$; AOPP: $p = 0.280$; Cotinine $p = 0.688$). We aimed to show the negative effects of smoking on adolescents' health with biochemical data. We think that it may be useful in taking precautions to increase family and social awareness regarding risky behaviors such as smoking.
**Keywords:** Cotinine, smoking, oxidative stress, adolescent.

## GİRİŞ
Ergenlik döneminin başlangıcı ve sonu ile ilgili oldukça farklı yaşlar sunulmaktadır. Bu tanımlar farklı kültürlerde belli yaşlara özgü olarak değişen toplumsal rol ve statülere bağlı olarak değişmektedir. Genel anlamda ergenlik yaşı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre 10-19 yaşları arasında tanımlanır (WHO 2006). Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması (TNSA) verilerine göre ülkemizde toplam nüfusun %19,7'si 10-19 yaş grubu, %28,6'sı 10-24 yaş grubu içindedir (TNSA 2003). Bu dönemde edinilen alışkanlıklar erişkin dönemi de etkileyebileceğinden dolayı bu dönemin riskli davranışlarının belirlenmesi son derece önemlidir (Coogan

ve ark). Bu bilgilere dayanarak ergenlerle ilgili Türkiye ölçeğinde çalışmaların sayısının oldukça az olduğunu söyleyebiliriz.

Ergenlik döneminde gençleri tehdit eden en önemli bağımlılık sigara bağımlılığıdır ve dünyada ve ülkemizde sigara kullanımına başlama yaşı gün geçtikte düşme eğilimdedir (WHO 2006). Türkiye'de sigara içme sıklığı 15 yaş üzeri yetişkinlerde %27,1 iken, gençlerde bu oran %8,4'tür (Küresel Yetişkin Tütün Araştırması Türkiye 2012).

Ulusal Uyuşturucu Kullanımı Enstitüsü (National Institute on Drug Abuse)'ne göre sigara kullananların büyük bir kısmının sigaraya ergenlik döneminde başladığı ve genç yaşta başlayanların nikotin bağımlılığı geliştirme ve sigarayı bırakmada sıkıntı çekmelerinin daha olası olduğu vurgulanmıştır (Walker ve Loprinzi, 2014). Gelecekteki Ulusal Ergen İlaç Trendlerini İzleme (2017) raporuna göre 12. sınıf öğrencilerinin %9,7'si, 10. sınıf öğrencilerinin % 5'i ve 8. sınıf öğrencilerinin %1,9'u bir ay içerisinde sigaraya başladılar (Schulenberg ve ark, 2017).

Sigara; yaygın ateroskleroz ve diğer iskemik hastalıklar için major bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Sigara, kan koagülasyonundaki değişiklikler, ateroskleroz, lipid peroksidasyonundaki artış ve serum antioksidan düzeylerindeki azalmadan sorumlu tutulmuştur (Serafini ve Del Rio, 2004). Sigaranın vücutta hasara neden olan etkilerinin dokularda oluşturduğu oksidatif strese bağlı olduğu bilinmektedir. Bu hasar antioksidan sistemlerle önlenmeye ve giderilmeye çalışılır (Bruno ve Traber, 2006). Biz de bu çalışmaların paralelinde antioksidan sistem elemanlarından olan ve yaygın olarak kullanılan redükte glutatyon (GSH), ve lipit peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA)'in idrardaki düzeyini ölçük. Ayrıca nikotinin birincil metaboliti olan, son 48 saatten uzun süre tütün dumanına maruz kalmayı gösteren güvenilir ve geçerli bir biyolojik belirteç olduğu için kotinin düzeylerini ölçtük (Vartiainen, 2002). İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP'ler) ilk kez Witko-Sarsat ve ark. (1998) tarafından üremik hastaların plazmasında bulunmuştur (Witko-Sarsat ve ark, 1998). Daha sonra böbrek hasarı mekanizmalarını araştıran birçok çalışmanın konusu olmuştur. Reaktif oksijen türleri, bir tirozin yapısı oluşturmak için doğrudan tirozin amino asidi okside eder. Bu durum protein birikmesine ve parçalanmasına yol açar. Çapraz bağlardan oluşan bu ürünler AOPP'lerdir, ancak mekanizması bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamıştır (Šebeková ve ark,2012).

Bu çalışmada İstanbul ili merkezindeki lise öğrencilerinde toplumsal sağlık hizmeti konusunda iyileştirmeler yapabilmek için önerilerde bulunmamızı sağlayacak veriler elde etmek adına lise öğrencilerden toplanan idrar örneklerinde tam idrar tetkiki (TİT) ve idrar mikroskopisi, MDA, GSH, AOPP, Kotinin, vücut kitle indeksi (VKİ) incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOD

48. Lise Öğrencileri Araştırma Projeleri Yarışması (2018) kapsamında 'Sigara Kullananan Gençlerde Antioksidan ve Oksidan Seviyelerinin Gelişim Düzeylerine Etkisi' başlığı ile Kimya alanında yarışmaya başvurulmuştur. Çalışma için İstanbul ili merkezindeki bir lisede eğitim gören 16 - 17 yaşlarında olan lise son sınıf öğrencilerinin ailelerinden ve araştırmaya katılmayı kabul eden 28 gönüllü öğrenciden Aralık 2017 tarihinde spot idrar örnekleri toplandı.

Kocaeli Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında öğrencilerden alınan idrar örnekleri deneyin yapılacağı güne kadar -40$^{o}$C'de saklandı. Öğrencilerin idrar örnekleri cinsiyet gözetmeksizin sigara içen ve sigara içmeyen gruplar olarak ikiye ayrıldı. Gruplar vücut kitle indeksine (VKİ) göre ayrıca değerlendirildi

Idrarda kreatinin tayini ve TİT Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında BECKMAN COULTER DXI-600 otoanalizörü ile ölçüldü.

Redükte Glutatyon (GSH) miktarının ölçümü Ellman'ın tarif ettiği yönteme göre spektrofotometrik olarak ölçüldü (Ellman,1959). Malondialdehit miktarının ölçümü Buege'nın lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonuna dayanan manuel metod ile spektrofotometrik olarak ölçüldü Buege ve Aust, 1978). Kotinin düzeyleri ELISA kiti (Katalog No: E-EL-0064, ELABSCIENCE, USA) kullanılarak ölçüldü. AOPP'nin ölçümü Witko-Sarsat ve ark.'nın metoduna göre ölçüldü (Witko-Sarsat ve ark, 1998).

**İstatistiksel analiz;** IBM SPSS versiyon 20.0 programı kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmede test seçimi için normal dağılıma uygunluk testi yapıldı. Vücut kitle indeksi dışındaki parametrelerin normal dağılıma uymadığı tespit edildi. Normal dağılıma uymayan GSH/kreatinin, MDA/kreatinin, AOPP ve Kotinin verilerinin analizi için Mann Whitney U testi ile yapıldı. *p* değeri için anlamlılık 0,05 olarak kabul edildi. Vücut kitle indeksi oransal bir veri olduğu için normal dağılıma uymasına rağmen Mann Whitney U testi kullanıldı.

## BULGULAR

Araştırmaya katılan erkek öğrenci sayısı 19, kız öğrenci sayısı 9 dır. Sigara içme alışlanlıkları son iki yılda günde en az bir olan kişi sayısı 16 (%57,14) hiç içmeyen öğrenci sayısı 12 (%42,86)'dır.
Erkek grup arasında sigara içen erkeklerin yüzdesi %42,11, kadın kız öürencilerde sigara içen yüzdesi %88,88 olarak bulunmuştur. iken İdrarın kimyasal analizinde tüm öğrencilerin idrar örneklerinde asit pH gözlendi (pH~6.0). Otomatize idrar mikroskobisinde örneklerin çoğunda amorf ürat kristalleri ve daha az örnekte de kalsiyum okzalat kristalleri gözlendi.
Oksidan stres belirteci olarak idrar GSH ve MDA değerleri, idrar kreatinine oranlanarak istatistiksel analizi gerçekleştirildi. Tüm parametrelerin temel tanımlayıcı istatistik tablosu Tablo 1'de verilmiştir.
Cinsiyet farkı gözetmeksizin sigara içen ve içmeyen olarak ayrılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. p değerleri VKİ: p=0,189; GSH: p=0,133; MDA: p=0,074; AOPP: p=0,280; Kotinin: p=0,688 olarak bulunmuştur. Cinsiyetlere göre ayrıldığında erkek bireylerde GSH/kreatinin oranı açısından sigara içen ve içmeyen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p$=0,044). Sigara içmeyen erkek grupta GSH/kreatinin oranı daha yüksek bulunmuştur. MDA/kreatinin konsantrasyonunda ise sigara içen erkek grup ortalamasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Sperman korelasyon analizine bakıldığında erkek grupta AOPP ile Kotinin düzeyleri arasında pozitif yönde yüksek bir korelasyon görülmüştür (r=0,727, p=0,007).

## TARTIŞMA

Adölesanlarda sigara içme alışkanlığının çok yaygın olması ve gün geçtikçe sigaraya başlama yaşının düşmesi nedeniyle büyüme çağında oksidatif strese maruz kalma artmaktadır. Sigara içme alışkanlıklarının yanı sıra beslenme alışkanlıkları ve çevresel kirleticiler de adölesanlarda oksidatif hasarı arttırmaktadır. Bu nedenle oksidatif stres parametrelerini ölçebilmek için noninvaziv olması, elde edilebilirliğinin kolay olmasından dolayı lise öğrencilerinden idrar örnekleri toplanmıştır. Redükte glutatyon ve MDA konsantrasyonları kreatinine oranlanarak standardize edilmiştir. Ayrıca VKİ, sigara içmenin özellikle büyüme gelişmeyi olumsuz etkilerinin olabileceği hipotezinden yola çıkılarak analize dahil edilmiştir. Yüksek VKİ, erişkinlerde artmış oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (Block ve ark., 2002). 2005 yılında yapılmış olan prospektif bir çalışmada adelosan kızlarda sigara içiminin fiziksel büyümede gerilik yaptığı gösterilmiştir (Stice ve Martinez, 2005). Bizim çalışmamızda VKİ sigara içen ve içmeyen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamaktadır (p=0,189). Bunun bir sebebi az sayıda adölesanın çalışmaya dahil edilmesi olabilir. Diğer sebebi ise boy, kilo gibi değişkenlerin çok fazla faktör tarafından etkilenmesi nedeniyle VKİ, analizi oldukça zor bir parametredir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da sigara içmeyen erkek grupta VKİ oranı nispeten sigara içen gruptan yüksek bulunmuştur.
Redükte glutatyon seviyeleri sigara içmeyen grupta istatiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,044). Bu durum sigara kullanımının antioksidan savunma sistemi üzerine olumsuz etkisinin bir göstergesi olarak düşünelebilir. Yaşları 19 - 24 arasında değişen sporcu gençlerin sigara içen ve içmeyen olarak iki gruba ayrıldığı çalışmada sigara içmeyen grubun plazma GSH düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Sigara içen grup 0,55±0,10 ve sigara içmeyen grup 1,15±0,11 p<0,01) (Demirci ve ark., 2011).
İdrar numunesinde bakılan MDA/kreatinin değerinde sigara içimine göre 2 grup arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,308). Sağlıklı bireylerde normal olarak düşünülen idrar numunesinin hücresel içeriği yoktur. Bu durumda da idrar MDA düzeyi ölçümü için ideal olan kemilüminesans, GC-MS, LC-MS gibi teknikler (Tsikas ve ark., 2016) kullanılması iken bizim bu çalışmada manuel spektrofotometrik analiz yapılmış olması analizin duyarlılığını belli oranda azaltıcı faktör olmuştur. İdrar numunesi yerine literatürde daha sık kullanılan eritrosit veya plazma numunelerinde bakılan MDA daha anlamlı sonuölar verecektir. Böyle bir çalışmayı örnek verecek olursak, sigara dumanına maruz kalan adölesanlarda eritrosit ve plazma MDA seviyelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada kontrol grubuna kıyasla önemli derecede MDA konsantrasyonu yüksek bulunmuştur (Eritrosit çalışma grubu 6,3 ± 1,1 ve kontrol grubu 3,2 ± 0,4 nmol/ml p<0,00, plazma çalışma grubu 0,6 ± 0,5 ve 0,2 ± 0,04 nmol/ml, p<0,001) (Dundaroz ve ark., 2003).
İçilen her sigaranın nikotin içeriğinin yaklaşık %70-80'i kotinine metabolize olur. Kotinin, nikotinin birincil metabolitidir ve şu anda tütün dumanına maruz kalmanın en iyi biyobelirteci olarak kabul edilmektedir. Ayrıca kotinin analizi serum, idrar, tükürük ve saçta yapılabilir (CDC, 2013). Kotinin idrar numunesinde ölçümü yapılabilen bir parameter olmakla birlikte adolesanlarda sigara içiciliğinin araştırıldığı çalışmalara literatürde az rastlanmaktadır. Ayrıca, çevresel tütün dumanına maruz kalma ile kotinin düzeyleri arasında bir ilişkinin olduğu ve %5 oranında ergen idrar numunelerinde kotinin konsantrasyonunun fazla bulunduğu bir çalışmada gösterilmiştir (p=0.041) (Braverman ve ark., 2017). Çevresel tütün dumanı veya ailede sigara içiciliği, ergen

sigara içenlerde nikotin bağımlılığına sebep olabilir. Bizim çalışmamızda sigara içen ve içmeyen grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,688).

Literatürde idrarda AOPP düzeylerinin ölçüldüğü birçok çalışmaya rastlanmaktadır (Gleisner ve ark., 2006, Gyurászová ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda gruplar arasında AOPP konsantrasyonu açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,280).

Tam idrar tetkiki hastanelerde rutin klinik değerlendirmede sıkça istenilen bir testdir. Bu çalışmada tam idrar analizinde göze çarpan özellikleri kısaca özetlemek gerekirse; idrarda kimyasal parametrelerinden olan Ph değeri asidite gösteren 6.0 civarındadır. Bu durum genellikle proteinden zengin beslenme göstergesidir. Bunu destekler şekilde idrarın mikroskobik analizinde yoğun şekilde amorf ürat kristalleri görülmüştür. Yine toplumda sık görülen kalsiyum okzalat kristalleri varlığı gösterilmiştir.

Araştırmamızın kısıtlıklarına bakacak olursak, bireyler rastgele örnekleme tekniği kullanılmadan seçilmiştir. Örneklem sayısı cinsiyete göre gruplandırılmamıştır. GSH ve MDA gibi antioksidan oksidan durum değişkenlerinin değerlendirilmesi için ideal örnek kan numunesi iken numunenin elde edilmesindeki kolaylık ve etik onay istemi gerekmediğinden idrar örnekleri kullanılmıştır.

Bu çalışmamız TUBİTAK liseler arası proje yarışması kapsamında gerçekleştirilmiştir. Amaçlanan, geri dönüşü olmayan, mortalitesi ve morbiditesi yüksek klinik durumlara yol açan birincil faktörlerden olan ve toplumda kullanım sıklığı oldukça fazla olan sigara kullanımının zararları üzerine toplumsal farkındalığı arttırmaktır. Ayrıca sigara, bağımlılık yapıcı maddeler arasında en sık tüketilen, toplumsal kabülü olan oldukça zararlı ve kanserojen yüzlerce maddeyi içerisinde barındırmaktadır.

## SONUÇ

Sonuç olarak Dünya Sağlık Örgütü'nün de halk sağlığı sorunlarından biri olarak bildirdiği sigara içme alışkanlığının, çocuk ve adolesanlarda önlenmesi gelecek nesilleri daha sağlıklı bireylerden oluşan güçlü toplum inşaasında elzemdir.

## KAYNAKLAR

Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, Packer L 2002. Factors associated with oxidative stress in human populations. American journal of epidemiology, 156(3): 274-285.

Braverman BA, Lomelín GJ, Eugenio GCI, Barrientos-Gutierrez T 2017. Environmental Tobacco Exposure and Urinary Cotinine Levels in Smoking and Nonsmoking Adolescents. Nicotine & Tobacco Research, 20(4): 523-526.

Bruno RS, Traber MG 2006. Vitamin E biokinetics, oxidative stress and cigarette smoking. Pathophysiology, 13(3): 143-149.

Buege JA, Aust SD 1978. Microsomal lipid peroxidation. In Methods in enzymology, 52: 302-310.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2013. Cotinine. [Çevirimiçi]. Ulaşılabilir URL: http://www.cdc.gov/biomonitoring/Cotinine_ BiomonitoringSummary.html, [Erişim Tarihi: 19.02.2020]

Coogan PF, Adams M, Geller AC, Brooks D, Miller DR, Lew RA, & Koh HK 1998. Factors associated with smoking among children and adolescents in Connecticut. American Journal of Preventive Medicine, 15(1): 17-24.

Demirci N, Beytut E, Kamiloğlu NN 2011. Sporcularda Sigaraya Bağlı Oluşan Oksidatif Hasar Üzerine A ve E Vitaminlerinin Koruyucu Etkileri. Kafkas Tıp Bilimleri Dergisi, (3): 109-113.

Dundaroz MR, Turkbay T, Akay C, Sarici SU, Aydin A, Denli M, Gokcay E 2003. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse. Turkish Journal of Pediatrics, *45*(1): 43-45.

Ellman GL 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics, 82(1): 70-77.

Küresel Yetişkin Tütün Araştırması Türkiye Raporu, Ankara, 2012. Ulaşılabilir URL: https://havanikoru.saglik.gov.tr/dosya/dokumanlar/yayinlar/KYTA-2012-TR-25-07-2014.pdf

Schulenberg JE, Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG, Miech RA, Patrick ME 2017. Monitoring the Future national survey results on drug use, 1975-2016: Volume II, College students and adults ages 19-55. http://www.monitoringthefuture.org//pressreleases/17drugpr.pdf. Accessed January 2, 2018.

Šebeková K, Klenovicsová K, Ferenczová J, Hedvig J, Podracká LU, Heidland A 2012. Advanced oxidation protein products and advanced glycation end products in children and adolescents with chronic renal insufficiency. J. Ren. Nutr. 22(1): 143-148. doi: 10.1053/j.jrn.2011.10.022

Serafini M, Del Rio D 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? Redox report, 9(3): 145-152.

Stice E, Martinez EE 2005. Cigarette smoking prospectively predicts retarded physical growth among female adolescents. Journal of Adolescent Health, 37(5): 363-370.

Tsikas D, Rothmann S, Schneider JY, Suchy MT, Trettin A, Modun D, ...Frölich JC 2016. Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC–MS and GC–MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15 (S)-8-iso-prostaglandin F2α and nitric oxide (NO). Journal of Chromatography B, 1019: 95-111.

Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması (TNSA) 2003. Hacettepe Nüfus Etüdleri Enstitüsü 2003; Ulaşılabilir URL: http://www.hips.hacettepe.edu.tr/tnsa2003/da ta/turkce/bolum2.pdf. [Erişim Tarihi: 16.10.2018].

Vartiainen E, Seppälä T, Lillsunde P, Puska P 2002. Validation of self-reported smoking by serum cotinine measurement in a community-based study. Journal of Epidemiology & Community Health, 56(3): 167-170.

Walker JF, Loprinzi PD 2014. Longitudinal examination of predictors of smoking cessation in a national sample of US adolescent and young adult smokers. Nicotine & Tobacco Research, 16(6): 820-827. doi:10.1093/ntr/ntu005.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure1, 2. J. Immunol. 161(5): 2524-32. doi: 10.1038/ki.1996.186.

World Health Organization (WHO) 2006. Child and adolescent health and development. WHO 2006; Ulaşılabilir URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43664/9789241595384_eng.pdf;jsessionid=347684D211B24D9DD7F5090F377DFE07?sequence=1 [Erişim Tarihi:16.10.2018].

World Health Organization (WHO) 2014. Tobacco. Fact sheet No. 339. Geneva, Switzerland, 2014. Ulaşılabilir URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en (Erişim Tarihi: 16.10. 2018).

Gleisner A, Martinez L, Pino R, Rojas IG, Martinez A, Asenjo S, Rudolph MI 2006. Oxidative stress markers in plasma and urine of prepubertal patients with type 1 diabetes mellitus. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 19(8): 995-1000.

Gyurászová M, Kovalčíková A, Janšáková K, Šebeková K, Celec P, Tóthová Ľ 2018. Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice. Physiological Research, 67(6): 921.

**Tablo 1.** Verilerin temel tanımlayıcı istatistik tablosu

| | **Erkek Öğrenci** | | **Kız Öğrenci** | |
|---|---|---|---|---|
| | Sigara İçen ortalama+ss ortanca(min-maks) | Sigara İçmeyen ortalama+ss ortanca (min.-maks.) | Sigara İçen ortalama+ss ortanca (min.-maks.) | Sigara İçmeyen ortalama+ss ortanca (min.-maks.) |
| **n** | 8 | 11 | 8 | 1 |
| **VKİ** | 22,44 ± 3,84<br>21,39 (17,96-29,91) | 25,97 ± 5,77<br>24,62 (18,61-35-92) | 22,44 ± 2,93<br>23,02 (16,53-25,349) | - |
| **GSH (mg/g kreatinin)** | 1,53 ± 0,60<br>1,47 (0,63-2,85) | 2,31 ± 1,01*<br>1,98(1,26-4,21) | 1,78 ± 0,78<br>1,34 (1,07-3,22) | - |
| **MDA (µM/g kreatinin)** | 10,44 ± 3,58<br>10,42 (5,63-17,10) | 7,62 ± 3,23<br>6,88 (3,67-14,60) | 8,22 ± 2,14<br>7,68 (5,89-11,17) | - |
| **AOPP (µM/g kreatinin)** | 18,04 ± 9,64<br>13,54 (11,25-39,45) | 19,27 ± 4,33<br>19,56 (10,54-26,53) | 18,69 ± 10,66<br>16,24 (9,41-41,87) | - |
| **Kotinin (µg/g kreatinin)** | 20,57 ± 10,08<br>20,79 (8,71-41,73) | 21,38 ± 7,01<br>20,35 (13,00-36,90) | 22,75 ± 13,27<br>16,73 (11,53-49,87) | - |

( - )istatistiksel hesaplama için uygun değil.

# Potential of Turkish *Salix* L. species: Bioactivity and phytochemistry-a review

Tuğba Uçar Akyürek[1*], Pelin Acar [1]

[*1] National Botanical Garden of Turkey, Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey.

*Corresponding author e-mail: tugbaaa_ucar@hotmail.com

## Abstract

Willow is a rich genus that spreads with 500 species in the world. 27 species are found naturally in Turkey and 4 of them are endemic. Salicylates (salicylic acid and acetylsalicylic acid) extracted from willow species have been used for centuries because of their analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties and especially after the discovery of aspirin, interest in this genus has increased dramatically. However, studies have shown that the total salicin fraction in the willow bark is not sufficient to explain the pharmacological strength of the willow bark. Therefore, it is believed that the anti-inflammatory potential in willow bark can be explained by additional mechanisms, such as antioxidant activity provided by other phytochemical components, especially polyphenols and flavonoids. The previous studies on the antioxidant and anti-inflammatory effects of willow species also found in Turkey (*S. purpurea*, *S. alba*, *S. amplexicaulis*, *S.babylonica*, *S.elaeagnos*, *S.fragilis*, *S.triandra*, *S.caprea*, *S.aegyptiaca*) have shown potential in a great extend. According to recently published molecular and morphological data; *S.acmophylla*, *S.purpurea* subsp. *leucodermis* (endemic), *S.myrsinifolia* and *S.caucasica* were determined as the closest relatives to *Salix* species used in the previous phytochemical and bioactivity studies. In the current review study, it is strongly suggested that these species have potential to be utilized in pharmacological studies in the long run. When considering the richness of Turkey's willow species, selected Turkish *Salix* appears to have potential both in obtaining medicinal and food-related products and in preventing oxidative stress-related diseases. The potential is important to be evaluated for contributing the public health and the national economy.

**Keywords:** *Salix* L, Antioxidant, Bioactivity, Salicin, Flavonoid, Turkey.

## INTRODUCTION

### Pharmacological and Economic Importance of *Salix* L.

The 'Cortex Salicis' derived from bark of willow has been used in folk medicine and phytotherapy for many years. The 'Cortex Salicis' is the source of salicin which is the pioneer substance of aspirin when transformed to salicylic acid molecule (Baytop, 1999). Salicylates (salicylic acid and acetylsalicylic acid) have been used for centuries because of their analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties (Enayat and Banerjee, 2009). The mechanism is by inhibiting COX-1 (cyclooxygenase-1) and COX-2 (cyclooxygenase-2) and preventing prostaglandin synthesis. It has been observed that patients who use acetylsalicylic acid (aspirin) for a long time have a lower risk of developing cardiovascular diseases and colorectal cancer (Enayat and Banerjee, 2009). Nowadays, it is also used for cancer researches (Mahdi et al., 2006). Manson et.al (2010) states that low dose usage of aspirin for the protection from cardiovascular ailments made a good contribution to United States economy (Manson et. al., 2010). Therefore, medicinal and economic value of willow genus make it advantageous and excellent candidates for bioactivity and phytochemistry studies. Accordingly, salicylates contained in willow species have increased interest to this genus, especially after the discovery of aspirin. Nonetheless, pharmacological quality of the willow does not only arise from all out salicin portion in the willow bark. It is thought that antioxidant active ingredients such as polyphenol and flavonoid in willow bark contribute to the anti-inflammatory activity (Nahrstedt et al., 2007; Freischmidt et al., 2015; Shara and Stohs, 2015). Therefore, comprehending inflammation and antioxidant activity is crucial to interpret the pharmacological strength of the willow genus.

## Inflammation and Antioxidants

Irritants, patogens or injured cells cause body tissues to give biological response called inflammation. In this protective response, immune cells, molecular mediators and blood vessels take part and remove necrotic cells, damaged tissues and start tissue repair. Inflammation gives signs such as heat, redness, pain, loss of function, swelling and can be arranged as acute or chronic (Ferrero-Miliani et al., 2007). Inflammation causes many types of disorder such as myopaties, allergic reactions which mainly associate with immune system. On the other hand, non-inflammatory diseases associate with inflammation are atherosclerosis, cancer, ischemic heart disease etc. (Kumar et al., 2014).

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) are free radicals creating oxidative stress on normal physiological function in humans, therefore, damages proteins, DNA and lipids. This situation generally lead to several health issues such as cardiovascular diseases, atherosclerosis, Alzheimer's disease and different kinds of cancers (Nauman et al., 2018). An antioxidant is responsible for the reduction of those reactive species on human body. The body makes use of antioxidants both endogenously and through diet. Antioxidants can be classified as enzymes such as glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase; proteins such as ferritin, albumin; hormones such as melatonin and small molecules taken through diet such as phenolic compounds, flavonoids, tocopherol, carotenoids (Huang et al., 2005).

## Taxonomy of Turkish *Salix* L.

According to the old taxanomic records, willow is a rich breed that spreads with 300 species in the world (Argus, 1997). In the light of new sources, the species found in the willow genus are grown all over the world and are represented by approximately 500 species (Hardig et al., 2010; Acar, 2017). Willow species, which are more common in the northern hemisphere, are predominantly found in China (270 species), the Russian and Central Asian Republics (120 species). The number is 65 species for Europe (Argus, 1997). 27 species are found naturally in Turkey and 4 of them are endemic, namely; *Salix trabzonica* A.Skvortsov, *Salix purpurea* subsp. *leucodermis* Yalt., *Salix rizeensis* Güner & Ziel., and *Salix anatolica* Ziel. & D.Tomasz. (Skvortsov and Edmondson, 1982; Donner, 1990; Güner and Zielinski, 1993; Güner, 2000). The richest region of willow in Turkey is the Black Sea region with 23 species and it is followed by East Anatolia Region with 15 species (Arıhan and Güvenç, 2009; Değirmenci et al., 2019). Thus, Turkey with a rich diversity of willow contains a high potential for bioactivity and phytochemistry researches.

In the light of these data and considering the importance of willow genus, the results of studies that are positive for the antioxidant and anti-inflammatory activities of willows also found in Turkey were compiled in this review (Alam et al., 2006; Nahrstedt et al., 2007; Enayat and Banerjee, 2009; Sulaiman et al, 2013; Freischmidt et al., 2015; Gligorić et al., 2019; Nauman et al., 2020).

With the review study, the previous pharmacological studies on *Salix* species were underlined according to literature and potential relatives of them naturally found in Turkey were determined according to newly published data sets. So it will brings about a new insight into *Salix* bioactivity and phytochemistry studies.

## REVIEW OF RESULTS

### Phenolic capacity, antioxidant and anti-inflammatory potential of *Salix* L.

Nahrstedt et al. (2007) states that "The European Pharmacopoeia defines willow bark as the whole or fragmented dried bark of young branches or dried pieces of current year twigs of various species of the genus *Salix*; including *Salix purpurea* L., *Salix daphnoides* Vill. and *Salix fragilis* L." (Nahrstedt et al., 2007). Willow bark extract contains approximately 20% flavonoid and condensed tannins. In the study of Nahrstedt et al. (2007), it was shown in the *in vitro* results that the total effect of willow bark extract is caused by polyphenol, flavonoid and proanthocyanidins and the contribution of salicin derivatives is low. *In vivo* results, on the other hand, showed that the total effect can not only be explained by the salicin fractions and other components also have contribution (Nahrstedt et al., 2007).

According to clinical and pharmacological studies conducted in willow bark extract (*Salix purpurea* and other *Salix* species), it was emphasized that not only salicylic alcohol derivatives but also polyphenols have an important role in providing anti-inflammatory effects (Freischmidt et al., 2015).

In another study, extracts from bark and leaves of 7 species of willow, they are also naturally occurring in Turkey, were prepared and the chemical content and antioxidant power of these extracts were analyzed. As a result; 13 compounds (chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, trans-cinnamic acid, gallic acid, p-hydroxybenzoic acid, syringic acid, p-coumaric acid, flavonoids, rutin, epicatechin, quercetin, naringin) were identified. DPPH (1, 1-Diphenyl- 2-Picrylhydrazyl free radical scavenging) and OH scavenging antioxidant activities of these extracts are shown in the Table 1 (Gligorić et al., 2019).

**Table 1:** DPPH and OH radical scavenging activity of bark and leaves extracts of species from the genus *Salix* L. (Gligorić et al., 2019).

| Species | DPPH | | OH | |
|---|---|---|---|---|
| | Bark | Leaf | Bark | Leaf |
| | IC50 (µg / ml) | | | |
| ***Salix alba*** | 1.83±0.09 | 2.43±0.11 | 34.76±0.24 | 42.18±0.32 |
| ***Salix amplexicaulis*** | 2.12±0.12 | 7.05±0.15 | 51.69±0.31 | 31.38±0.14 |
| ***Salix babylonica*** | 2.59±0.16 | 4.43±0.17 | 40.44±0.56 | 44.61±0.39 |
| ***Salix eleagnos*** | 2.34±0.28 | 5.51±0.19 | 29.71±0.29 | 51.96±0.14 |
| ***Salix fragilis*** | 4.11±0.13 | 8.07±0.43 | 22.20±0.36 | 25.15±0.46 |
| ***Salix purpurea*** | 4.73±0.26 | 7.34±0.16 | 26.31±0.63 | 63.51±0.17 |
| ***Salix triandra*** | 7.79±0.21 | 1.95±0.08 | 28.01±0.29 | 36.10±0.18 |

While the highest radical scavenging activity against DPPH was observed in *Salix alba* L. bark extract, the lowest was observed in *Salix triandra* L. bark extract. However, *Salix triandra* leaf extract had the highest DPPH scavenging activity among other leaf extracts (Gligorić et al., 2019).

*In vitro* studies on the ethanol extract obtained from *Salix caprea* L. flowers showed a strong antioxidant effect and high amounts of polyphenols. The extract remerkably and dose dependently scavenged DPPH, hydrogen peroxide (H2O2), superoxide (O2) and nitric oxide (NO) (Alam et al., 2006).

*Salix aegyptiaca* L. plant extracts of leaves, bark and flowers with varying polarities were prepared and the highest antioxidant activity (DPPH), total flavonoid and total phenolic content were observed in the ethanol extract. Besides, the results were found at a high rate in all extracts (Enayat and Banerjee, 2009).

Antioxidant (DPPH), total phenolic content (Folin-Ciocalteu methods), cytotoxic and antimicrobial (against the Human Leukemia cell line) effects of *Salix alba* plant ethanol extract were examined and it was emphasized that the strong antimicrobial and cytotoxic effect was caused by the antioxidant potential of the extract according to the *in vitro* results (Sulaiman et al., 2013).

It is known that *Salix aegyptiaca* has antioxidant property and based on this, hydroethanolic extract of *Salix aegyptiaca* bark was evaluated for its hepatoprotective effects in Nauman et al. (2020) work. Antioxidant scavenging property of the bark extract was determined by Nitric oxide scavenging assay and inhibition of nitrite ions production was observed by adding Griess reagent. In the study, ascorbic acid was used as control and IC50 value was 17.71±0.34 µg/mL (Nauman et al., 2020). In *ex vivo* part of the study, Fenton's reagent was used as OH free radical generator to damage protein carbonyl content, after applying *S. aegyptiaca* bark extract, remarkable protection was observed besides, peroxidative damage inhibition was noticed (Nauman et al., 2020). In addition to this, *Salix aegyptiaca* bark extract increased the activity of enzymes such as glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase which metabolise the free radicals produced by cells. Therefore, *Salix aegyptiaca* has strong antioxidant potential (Nauman et al., 2020).

**Potential of Turkish *Salix* L.**

Nowadays, molecular phylogenetic studies have become popular tools in taxonomic treatments and in applied science such as agriculture, forestry and pharmacology (Gomez-Serranillos et al., 2014). The wild relatives of

important species have been used in cross breeding studies for many years (Knapp and Peralta, 2016). Understanding phylogenetic relationship and determining relatives in economically important genus give rise to new research area in a shorter way (Schramm et al., 2019). In literature reviewes, the best studied *Salix* species from a pharmacological point of view are *S. purpurea, S. alba, S. amplexicaulis, S.babylonica, S.elaeagnos, S.fragilis, S.triandra, S.caprea* and *S.aegyptiaca* as mentioned above. According to recently published morphological and combined molecular evidence, the phylogenetic relationship between all Turkish *Salix* species were showed and represented in Figure 1 (Acar, 2017). The pylogenetic relationships were characterized by chloroplast (*trn*T-F, *mat*K, and *rbc*L) and nuclear gene (*ITS*) regions (Acar, 2017). Besides, the morphological measurements including 11 vegetative and selective characters of *Salix* were considered to comprehend relationships (Acar, 2020).

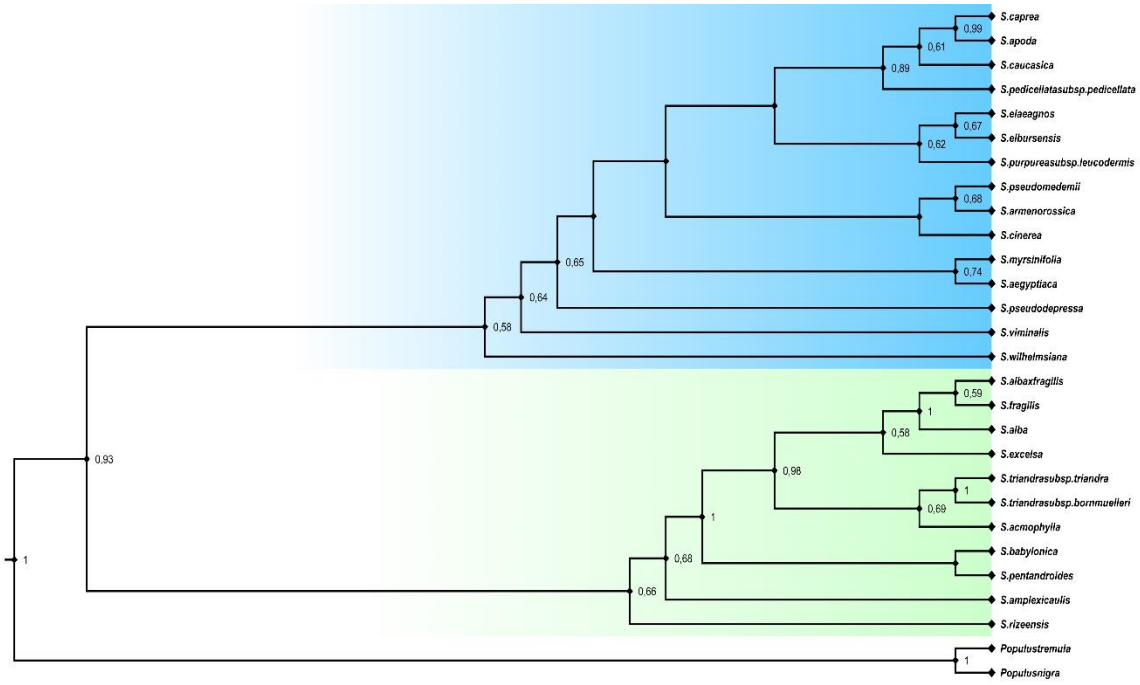



**Figure 1.** Phylogenetic tree respresenting the relatives of Turkish *Salix* species (Acar, 2017).

Based on phylogenetic and morphological analysis of Turkish willows, close relations gives clues about which species to be focused on in terms of phytochemical studies. As it is shown in Table 2, the closest relatives of the commonly used willow species in bioactivity studies were determined as regards morphological and molecular data. The identified most closest relatives species were *S.acmophylla*, *S.purpurea* subsp. *leucodermis* (endemic), *S.myrsinifolia* and *S.caucasica.*

*S.acmophylla* was determined the closest relative of *S.babylonica* and *S.triandra*. *S. acmophylla* is naturally found in the Eastern part of Turkey and the sample of species are located in Şanlıurfa and Batman (Figure 2). Other identified relative was *S.purpurea* subsp. *leucodermis* (endemic) which was very close to *S.purpurea* and *S.elaeagnos* (Figure 3). The endemic species are found in Ağla Village, Dana River and Gökçeova Lake in Muğla (Acar, 2017). *S.myrsinifolia* was recorded as highly similar to *S.elaeagnos* and *S.aegyptiaca.* The representatives of this species are naturally located in Ilgaz, Kastamonu (Avcı, 1997). *S.caucasica* was determined as the relative of *S. caprea*. The appearance of both shrub species are very similar to each other but *S. caucasica* is mainly located in Artvin and Rize (Tunçtaner, 1990).

**Table 2:** Table shows the closest relatives of *Salix* species found in Turkey and used in the phytochemical and bioactivity studies.

| No | Species used in the phytochemical and bioactivity studies | The determined closest relatives of the *Salix* species in Turkey according to molecular and morphological data set ( Acar, 2017; Acar et al., 2020). |
|---|---|---|
| 1 | *S. purpurea* | *S.purpurea* subsp. *leucodermis* (endemic) |
| 2 | *S. alba* | *S.fragilis*, *S.excelsa* |
| 3 | *S. amplexicaulis* | *S.alba*, *S.babylonica* |
| 4 | *S.babylonica* | *S.acmophylla*, *S.amplexicaulis* |
| 5 | *S.elaeagnos* | *S.purpurea* subsp. *leucodermis* (endemic), *S.myrsinifolia* |
| 6 | *S.fragilis* | *S.alba* |
| 7 | *S.triandra* | *S.acmophylla*, *S.alba* |
| 8 | *S.caprea* | *S.caucasica* |
| 9 | *S.aegyptiaca* | *S.myrsinifolia* |

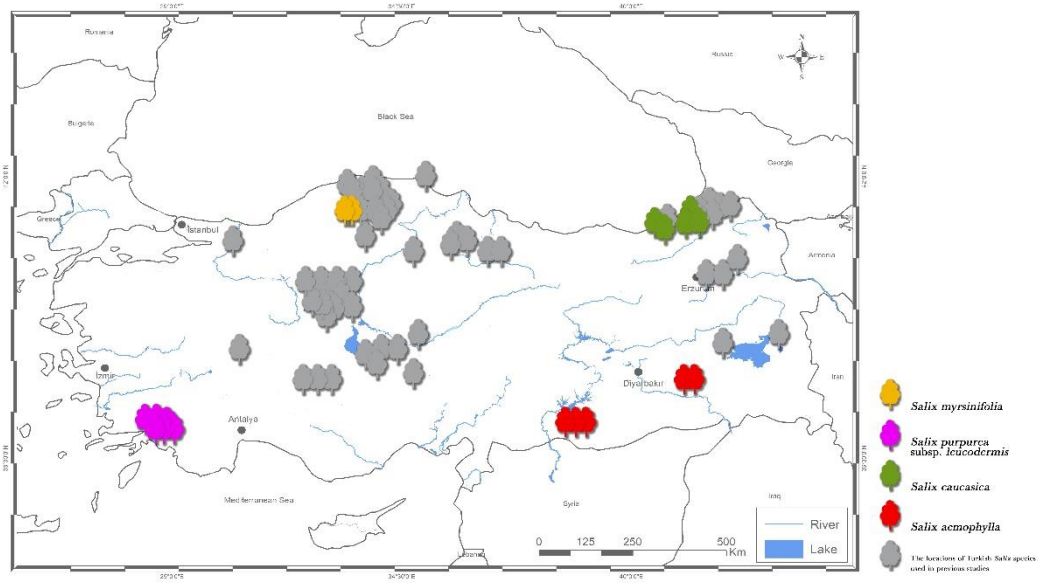



**Figure 2**. Some locations of *Salix* species used in the previous studies and their relatives' locations proposed for future studies, naturally occuring in Turkey



**Figure 3.** The branches and leaves image of endemic species; *Salix purpurea* subsp. *leucodermis*

## CONCLUSION

The antioxidant power of willow genus and its contribution to its anti-inflammatory effect has been emphasized in many studies. The species used in those studies (*S. purpurea*, *S. alba*, *S. amplexicaulis*, *S.babylonica*, *S.elaeagnos*, *S.fragilis*, *S.triandra*, *S.caprea*, *S.aegyptiaca*) have shown positive results as far as pharmacology is concerned and they also have natural distribution in Turkey. The results are based on a scientific basis for the effects of this breed, which has been used as a pain reliever in folk medicine for many years. *S.acmophylla*, *S.purpurea* subsp. *leucodermis* (endemic), *S.myrsinifolia* and *S.caucasica* which are the closest relatives to *Salix* species used in phytochemical and bioactivity studies were determined according to newly published information. This review highlights the potential of these species and their use is highly recommended for future pharmacological studies. When the rich distribution of *Salix* genus in Turkey and its pharmacologic potency were considered, it could be utilized for the protection from oxidative stress-induced diseases and obtaining food related products. Reviewed data suggested that utilization of *Salix* genus of Turkey may contribute to the public health and national economy.

## ACKNOWLEDGEMENT

Many thanks to Tuğçe Alp for her effort on expert map design.

## REFERENCES

Acar P 2017. Molecular Phylogenetics of Turkish *Salix* L. species (Unpublished Ph.D. Thesis), Middle East Technical University, 123pp., Ankara Turkey.

Acar P, Taşkıran B, Değirmenci FÖ, Kaya Z 2020. Turkish *Salix* species: Molecular phylogeny and morphology. Forestist DOI: 10.5152/forestist.2020.19029.

Alam MS, Kaur G, Jabbar Z, Javed K, Athar M 2006. Evaluation of antioxidant activity of *Salix caprea* flowers. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, *20*(6), 479-483.

Argus GW 1997. Infrageneric classification of *Salix* (Salicaceae) in the new world. Systematic Botany Monographs, 1-121.

Arıhan O, Güvenç A 2009. Ankara çevresinde yetisen söğüt (*Salix* L. ) türleri, Ot Sistematik Botanik Dergisi, 15-52.

Avcı M, Zielinski J 1997. *Salix myrisinifolia* Salisb. (Salicaceae)-A new species for Flora of Turkey. Karaca Arboretum Magazine, 4(2), 49-54.

Baytop T 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Second edition, 480pp., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Degirmenci FO, Acar P, Kaya Z 2019. Consequences of habitat fragmentation on genetic diversity and structure of *Salix alba* L. populations in two major river systems of Turkey. Tree Genetic Genomes: 15: 59.

Donner J 1990. Distribution maps to P.H. Davis 'Flora of Turkey 1-10' Linzer Biologische Betrage 2: 381-515.

Enayat S, Banerjee S 2009. Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. Food Chemistry, 116(1), 23-28.

Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE 2007. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1β generation. Clinical & Experimental Immunology, 147(2), 227-235.

Freischmidt A, Untergehrer M, Ziegler J, Knuth S, Okpanyi S, Müller J, Kelber O, Weiser D, Jürgenliemk G 2015. Quantitative analysis of flavanones and chalcones from willow bark. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 70(9), 565-568.

Gligorić E, Igić R, Suvajdžić L, Grujić-Letić N 2019. Species of the genus *Salix* L.: Biochemical screening and molecular docking approach to potential acetylcholinesterase inhibitors. Applied Sciences. 2019 Jan;9(9):1842.

Gomez-Serranillos MP, Fernandez-Moriano C, Gonzalez-Burgos E, Divakarb PK, Crespob A 2014. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features, Royal Society of Chemistry, 4: 59017.

Güner A 2000. *Salix*, L. In: Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer, KH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.11, Edinburgh: Edinburgh University Press.

Güner A, Zielinski J 1993. *Salix rizeensis* (Salicaceae): a new willow from NE, Turkey, Karaca Arboretum 1: 1-5.

Hardig TM, Anttila CK, Brunsfeld SJ 2010. A phylogenetic analysis of *Salix* (Salicaceae) based on *mat*K and ribosomal DNA sequence data. Journal of Botany.

Huang D, Ou B, Prior RL 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(6), 1841-1856.

Knapp S, Peralta IE 2016. The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives. In: Causse M., Giovannoni J., Bouzayen M., Zouine M. (eds) The Tomato Genome. Compendium of Plant Genomes. Springer, Berlin, Heidelberg.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC 2014. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book. Elsevier Health Sciences.

Mahdi JG, Mahdi AJ, Mahdi AJ, Bowen ID 2006. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. Cell Proliferation Journal, 39, 147-155.

Manson SC, Benedict A, Pan F, Wittrup-Jensen KU, Mark Fendrick A 2010. Potential economic impact of increasing low dose aspirin usage on CVD in the US. Current Medical Research and Opinion, 26(10), pp.2365-2373.

Nahrstedt A, Schmidt M, Jäggi R, Metz J, Khayyal MT 2007. Willow bark extract: The contribution of polyphenols to the overall effect. Wiener Medizinische Wochenschrift, 157(13-14), 348-351.

Nauman M, Kale RK, Dhruve P, Singh RP 2020. Determination of antioxidant potential of *Salix aegyptiaca* L. through biochemical analysis.

Nauman M, Lalita L, Kale RK, Rajamani P, Singh RP 2018. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Salix aegyptiaca* bark extract attribute to its anticancer efficacy. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 8(4), 272-276.

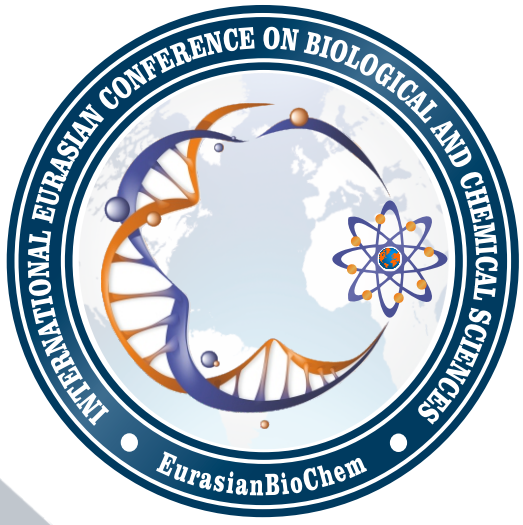
Shara M, Stohs SJ 2015. Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) extracts. Phytotherapy Research, 29(8), 1112-1116.

Schramm T, Schachtschneider Y, Schmiemann P 2019. Evolution: Education Outreach, 12: 11.

Skvortsov AK, Edmondson JR 1982. *Salix* L. In: Davis PH, editor. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press. pp 694 – 716.

Sulaiman GM, Hussien NN, Marzoog TR, Awad HA 2013. Phenolic content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanolic extract of *Salix alba*. American Journal of Biochemical Biotechnology, 9(1), 41-46.

Tunçtaner K 1990. Çeşitli söğüt klonlarının genetik varyasyonları ve Türkiye'nin değişik yörelerine adaptasyonları üzerine araştırmalar, Kavak ve Hızlı Gelişen Yabancı Tür Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü, 136pp.




EJBCS
Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences
www.dergipark.org.tr/ejbcs