



TRAKYA UNIVERSITY



JOURNAL OF NATURAL SCIENCES

18 Cilt
Volume

1 Sayı
Number

Haziran
June

2017

TRAKYA
UNIVERSITY
JOURNAL OF
NATURAL
SCIENCES

TUJNS

Trakya Univ J Nat Sci

ISSN 2147-0294

e-ISSN 2528-9691

**Trakya University
Journal of Natural Sciences**

Cilt: 18

Sayı: 1

Haziran

2017

**Trakya University
Journal of Natural Sciences**

Volume: 18

Number: 1

June

2017

Trakya Univ J Nat Sci

<http://dergipark.gov.tr/trkjnat>

e-mail: tujns@trakya.edu.tr

ISSN 2147-0294
e-ISSN 2528-9691

Dergi Sahibi / Owner

Trakya Üniversitesi Rektörlüğü
Fen Bilimleri Enstitüsü Adına
On behalf of Trakya University Rectorship, Graduate
School of Natural and Applied Sciences
Prof. Dr. Murat YURTCAN

Editör / Editor

Doç. Dr. Kadri KIRAN

Başkan / Chairman

Prof. Dr. Murat YURTCAN

Dergi Yayın Kurulu / Editorial Board

Abdel Hameed A. AWAD	National Research Center, Dokki Giza	Egypt
Ayşegül ÇERKEZKAYABEKİR	Trakya Üniversitesi	Edirne (Sayfa Editörü/Copyeditor)
Bálint MARKÓ	Babeş-Bolyai University	Romania
Burak ÖTERLER	Trakya Üniversitesi	Edirne (Dizgi/Design)
Celal KARAMAN	Trakya Üniversitesi	Edirne (Sayfa Editörü/Copyeditor)
Herdem ASLAN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	Çanakkale
İlgaz AKATA	Ankara Üniversitesi	Ankara
İnanç ÖZGEN	Fırat Üniversitesi	Elazığ
İskender KARALTI	Yeditepe Üniversitesi	İstanbul
Medine SİVRİ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Eskişehir (Türkçe Dil Editörü/Turkish Language Editor)
Mustafa YAMAÇ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Eskişehir
Naime ARSLAN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Eskişehir
Necmettin Güler	Trakya Üniversitesi	Edirne
Necmi AKSOY	Düzce Üniversitesi	Düzce
Özkan DANIŞ	Marmara Üniversitesi	İstanbul
Saliha ÇORUH	Atatürk Üniversitesi	Erzurum
Volkan AKSOY	Trakya Üniversitesi	Edirne (İngilizce Dil Editörü/English Language Editor)
Yeşim SAĞ	Hacettepe Üniversitesi	Ankara
Yıldız AYDIN	Marmara Üniversitesi	İstanbul

Yazışma Adresi / Correspondence Address

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Binası, Balkan Yerleşkesi – 22030 Edirne / TÜRKİYE
e-mail: tujns@trakya.edu.tr
Tel: +90 284 2358230
Fax: +90 284 2358237

Bu dergi hakemli bir dergidir, CiteFactor, DOAJ (Directory of Open Access Journal), DRJI (Directory of Research Journal Indexing), ResearchBib, Google Akademik, Science Library Index, SIS (Scientific Indexing Services), TUBITAK-ULAKBIM Yaşam Bilimleri Veri Tabanı (TR Dizin) ve Zoological Record (Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi olarak) tarafından dizinlenmektedir.

This Journal is a peer reviewed journal and is indexed by CiteFactor, DOAJ (Directory of Open Access Journal), DRJI (Directory of Research Journal Indexing), ResearchBib, Google Scholar, Science Library Index, SIS (Scientific Indexing Services), TUBITAK-ULAKBIM Life Sciences Database (Turkish Journal Index) and Zoological Record (as Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi).

Baskı / Publisher

Trakya Üniversitesi Matbaa Tesisleri / Trakya University Publishing Centre

TRAKYA UNIVERSITY JOURNAL OF NATURAL SCIENCES

Cilt (Volume) 18

Sayı (No) 1

Haziran (June) 2017

İnceleme ve Değerlendirmeye Katkıda Bulunanlar

(Scientific Advisory Board)

Arzu GÖRMEZ (Erzurum)

Burhan ŞEN (Edirne)

Celal KARAMAN (Edirne)

Emrah ÇAKMAKÇI (İstanbul)

Faruk SELÇUK (Kırşehir)

Gazi GÖRÜR (Ankara)

Güldem DÖNEL AKGÜL (Erzincan)

Hakan ALLI (Muğla)

Hakan KARABULUT (İstanbul)

Handan BAYSAL (İzmir)

Hasan CİVELEK (Muğla)

Hüseyin ERDUĞAN (Çanakkale)

İskender KARALTI (İstanbul)

Kadriye İNAN BEKTAŞ (Trabzon)

Mehtap ERŞAN (Sivas)

Mustafa YAMAÇ (Eskişehir)

Özal MUTLU (İstanbul)

Özgür BAYTUT (Samsun)

Pınar ÇAĞLAYAN (İstanbul)

Rasime DEMİREL (Eskişehir)

Yakup ŞENYÜZ (Kütahya)

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Araştırma Makalesi/Research Article

1. Nilgün BECENEN, Gühergül ULUÇAM, Özlen ALTUN 1-7
Synthesis and Antimicrobial Activity of Iron Cyclohexanedicarboxylic Acid and Examination of pH Effect on Extraction in Water and Organic Phases
Sikloheksandikarboksilli Asidin Sentezi ve pH Etkisi ile Su ve Organik Fazlardan Ekstraksiyonunun İncelenmesi
2. Saliha ŞAHİN, Gülçin TEZCAN, Cevdet DEMİR, Berrin TUNCA, Gülşah ÇEÇENER, Ünal EGELİ 9-13
Cytotoxic Activity of Rosmarinic Acid Isolated from *Prunella vulgaris* L. and *Prunella grandiflora* L. in Different Tumor Cells
Prunella vulgaris L. ve *Prunella grandiflora* L.'den Saflaştırılan Rosmarinik Asitin Farklı Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi
3. Ilgaz AKATA, Yasin UZUN 15-24
Macrofungi Determined in Uzungöl Nature Park (Trabzon)
Uzungöl Tabiat Parkı (Trabzon)'ndan Belirlenen Makrofunguslar
4. Çiğdem KÜÇÜK 25-32
Yabani *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. Ex Boiss Kök Nodüllerinden İzole Edilen *Rhizobium* Frank İzolatlarının Tuz Toleransı ve PHB Üretimi
Salt tolerance and PHB production of *Rhizobium* Frank isolates of root nodules of wild *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss
5. Serkan ÖRTÜCÜ, Nurcan ALBAYRAK İSKENDER 33-38
Determination of Control Potentials and Enzyme Activities of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. Isolates Against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)
Beauveria bassiana (Bals.) Vull. İzolatlarının *Tetranychus urticae* Koch'a (Acari: Tetranychidae) Karşı Kontrol Potansiyellerinin ve Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi
6. Hasan AKGÜL, Mustafa SEVİNDİK, Şanlı KABAKTEPE, Ayşen ÖZÇANDIR, Candan KEMALOĞLU AYKURT, Ilgaz AKATA 39-40
A New Host Species for *Uromyces behenis* (DC.) Unger
Uromyces behenis (DC.) Unger İçin Yeni Bir Konakçı Tür

7. *Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ, Nükhet N. ZORBA* **41-47**
Çanakkale (Yenice) İlinde Üretilen Çiğ Sütlerin Bazı Özellikleri ve Subklinik (Gizli) Mastitis Görülme Oranı
Some Properties of Raw Milk Produced in Çanakkale (Yenice) City and The Incidence of Subclinical (Hidden) Mastitis

8. *Gühergül ULUÇAM* **49-54**
3-(2-Hidroksietil)-1-(3-Aminopropil)-1H-İmidazol-3-İum Bromid Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktiviteleri
Synthesis, Characterization and Biological Activities of 3-(2-Hydroxyethyl)-1-(3-Aminopropyl)-1H-Imidazole-3-Ium Bromide

9. *Meltem KAYA TUZ, Ahmet ASAN, Suzan ÖKTEN* **55-58**
Devam Sütlerinde Aflatoksin M1 Varlığının Elisa Yöntemiyle Tespit Edilmesi
Determination of Aflatoxin M1 on Follow-on Milk by ELISA Method

Kısa Not/Short Communication

10. *Seda Emel TEK, Zühal OKYAR* **59-64**
Bazı Herbivor Böcekler Hakkında Biyolojik Gözlemler
Biological Observations on Some Herbivorous Insects

Derleme/Review

11. *Dilek YALÇIN DUYGU, Abel Udo UDOH* **65-69**
Validation of Microbiological Testing Methods
Mikrobiyolojik Test Metotlarının Doğrulanması (Validasyonu)

SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF IRON CYCLOHEXANEDICARBOXYLIC ACID AND EXAMINATION OF pH EFFECT ON EXTRACTION IN WATER AND ORGANIC PHASES

Nilgün BECENEN^{1*}, Gühergül ULUÇAM², Özlen ALTUN²

¹ Trakya University, Vocational College of Technical Sciences, 22030 Edirne

² Trakya University, Department of Chemistry, 22030 Edirne

*Corresponding author: e-mail: nilgunbecenen@trakya.edu.tr

Received (Alınış): 06 January 2017, Accepted (Kabul): 06 February 2017, Online First (Erken Görünüm): 10 March 2017, Published (Basım): 15 June 2017

Abstract: In this study, iron cyclohexanedicarboxylic acid was synthesized under refluxing conditions. The structural characterization of the complex was performed by using physico-chemical and spectroscopic methods. The effect of pH on division constant (∞) and extraction percentages (% E) in water and organic phase was investigated with the extraction method. At the end of the experiment, most of the Fe²⁺ ions in the water phase at pH=7.5 passed into the organic phase. Above this pH, the extraction percentage decreased because of the transition from water phase to organic phase. Iron cyclohexanedicarboxylic acid was extracted with ether, petroleum ether, benzole and carbon tetrachloride from aqueous solution and microbial activities of the complex were studied. The activity data showed that iron cyclohexanedicarboxylic acid has an important antibacterial and antifungal activities.

Key words: Fe (II), cyclohexanedicarboxylic acid, synthesis, extraction.

Sikloheksandikarboksilli Asidin Sentezi ve pH Etkisi ile Su ve Organik Fazlardan Ekstraksiyonunun İncelenmesi

Özet: Bu çalışmada, reflux şartlarında demir sikloheksandikarboksilli asit sentezlenmiştir. Kompleksin yapısı fizikokimyasal ve spektroskopik metodlarla karakterize edilmiştir. Daha sonra reaksiyon sırasında pH'ın su ve organik fazlardaki paylaşma sabitleri (∞) ve ekstraksiyon yüzdelere (%E) etkisi ekstraksiyon metodu ile incelenmiştir. Deney sonucunda, su fazındaki Fe²⁺ iyonlarının çoğu pH=7.5'ta organik faza geçmiştir. Bu pH'tan sonra ekstraksiyon yüzdesi su fazından organik faza geçiş yüzünden azalmıştır. Demir sikloheksandikarboksilli asit eter, petrol eteri, benzol ve karbon tetra klorür ile sulu çözeltilerinden ekstre edilmiş, ilave olarak kompleksin mikrobiyal aktiviteleri çalışılmıştır. Aktivite sonuçları, demir sikloheksandikarboksilli asitin önemli antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Fe (II), sikloheksandikarboksilli asit, sentez, ekstraksiyon.

Introduction

Low molecular weight cyclic organic acids are liquids with disturbing odor and high viscosity, whereas high molecular weight cyclic acids are either liquids with light odor and low viscosity or solids. They are soluble in many organic solvents (Battersby *et al.* 1968, March 1985). Many studies on *cis* and *trans*-1,2-cyclohexanedicarboxylic acid have previously been published so far (Björkling *et al.* 1985, Reiznautt *et al.* 2009, Altun *et al.* 2010, Chen *et al.* 2014). For instance, the Hunsdiecker reaction of silver salts of *cis*- and *trans*-1,2-cyclohexanedicarboxylic acid was investigated by Abell (1957). Kamino *et al.* (1996) reported that the molecular packing was affected by the shape of polycarboxylate molecules in the case of phthalate, *cis*-1,2-cyclohexane dicarboxylate and 1,1-cyclohexanediacetate. Koster *et al.* (2001) examined hyperbranched synthetic polyesteramides synthesized by the polycondensation of trifunctional diisopropanolamine and dysfunctional

anhydrides of succinic acid, glutaric acid, *cis*-1,2-cyclohexanedicarboxylic acid and phthalic acid. We considered that if different metal salts of these compounds are synthesized, then they may be used in many different areas. For this purpose, we started a study with the aim of creation of iron salt of cyclohexanedicarboxylic acid to examine all aspects of this compound. We also investigated the extraction of the obtained iron cyclohexanedicarboxylic acid with pH effect between water and organic phase in addition to its antibacterial and antifungal activities.

Materials and Methods

Materials and Apparatus

Cyclohexanedicarboxylic acid (Aldrich) and diethylether (Merck) were all organic reagent grade, and FeSO₄ . 7H₂O (Merck) was analytical reagent grade.

Elemental analyses for C and H were obtained on dried samples using a Perkin Elmer 2400 elemental analyzer. FT-IR spectra were determined on a Perkin Elmer BXII spectrometer as KBr pellets in the frequency range 400-4000 cm^{-1} . UV/Vis spectra were recorded at 25°C with a Shimadzu UV-1700 Pharma spectrophotometer in the wavelength range 200-800nm. XRD analyses were investigated in Shimadzu XRD-6000. A calibrated Metrohm 654 digital pH meter with a pH glass electrode mounting was employed for pH measurements. The pH meter was adjusted before use with pH 4 and 7 Metrohm AG CH 9100 Hersau Buffers.

Synthesis of iron cyclohexanedicarboxylic acid

Method I. Two step substitution reaction

Step I: 20g (0.117mol) of cyclohexanedicarboxylic acid was dissolved in 150ml ether and placed on a magnetically-stirred heater. The system was heated and stirred to reflux while 10g (0.25mol) NaOH in 40ml water solution was added dropwise within 20-24 minutes. The reaction mixture was poured into an extraction funnel. The pH was adjusted to 7 by adding NaOH solution. Aqueous phase was removed and washed with ether, evaporated slowly and a white powder, identified as sodium dicarboxylic acid, was obtained (1) [Color: White. Yield (%): 82 %. M.P.: 232.6°C. FT-IR bands (cm^{-1}): 2878 cm^{-1} (ν_{CH}), 1738-1550 cm^{-1} ($\nu_{\text{carboxyl anions}}$), 1475 cm^{-1} (ν_{CO}). UV/Vis bands (nm): 302].

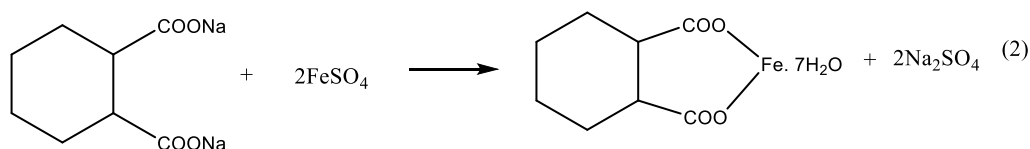
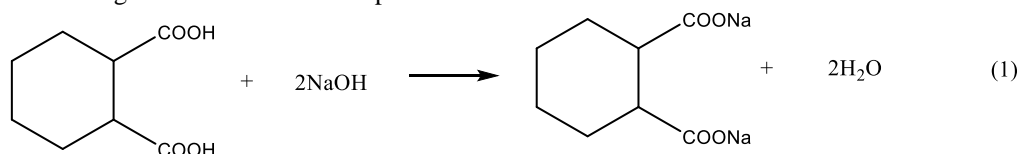
Step II: 5g (0.023mol) sodium dicarboxylic acid was dissolved in 20ml water and placed in a magnetically stirred 250ml three necked flask which was equipped with a thermometer, a water condenser and an additional funnel filled with 5g (0.018mol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution in 7ml water. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution was added dropwise at 85-90°C within one hour. At the end of the reaction, solid brown iron dicarboxylic acid was filtered and washed with distilled water several times to remove water soluble material. The remaining solid residue was kept under

vacuum producing a brown solid identified as iron dicarboxylic acid (2) [Color: Brown. Yield (%): 84. M.P.: 265°C. Elemental Analyses (%): Calc. C 42.55, H 4.23. Found: C 42.6, H 4.4. FT-IR bands (cm^{-1}): 2944 cm^{-1} (ν_{CH}), 1593-1532 cm^{-1} ($\nu_{\text{carboxyl anions}}$), 1436-1398 cm^{-1} (ν_{CO}). UV/Vis bands (nm): 290, 511. XRD (2θ): 5.2300, 14.9200 and 19.5600].

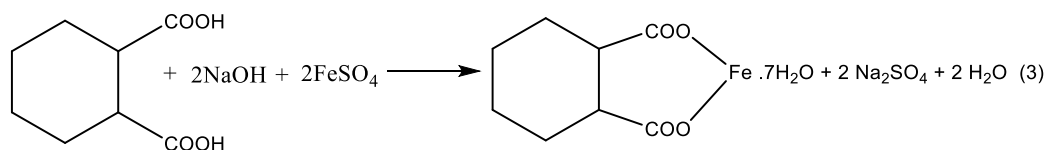
Method II: One step substitution reaction

A solution of 20g (0.11 mol) cyclohexanedicarboxylic acid in 150ml ether was placed in a magnetically stirred three necked flask on which a thermometer, a condenser and an additional funnel were attached. 10g (0.25mol) NaOH in 40ml water was placed in the additional funnel and dropwise addition was begun after internal temperature reached to 40-45°C with external heating. After NaOH addition was completed, 5g (0.018mol) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution in 7ml water was placed in the additional funnel and the previous operation was repeated at 85-90°C. Mixture was stirred for about one hour. During the progress of the reaction ether was lost gradually from the system. Finally, the liquid phase was filtered giving brown residue which was washed with distilled water to get rid of the water soluble impurities. The brown solid was oven dried giving a compound with a spectrum consistent with the spectrum of the compound obtained in Method I.

We adjusted the pH value of sodium dicarboxylic acid solution to 7 before treating it with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution in both methods to obtain the maximum yield. At pH values higher than 7 complications occur in the reaction as a result of a reaction between hydroxyl and iron ions (3) [Color: Brown. Yield (%): 89 %. M.P.: 265.2°C. Elemental Analyses (%): Calc. C 42.53, H 4.26. Found: C 42.6, H 4.4. FT-IR bands (cm^{-1}): 2944 cm^{-1} (ν_{CH}), 1605-1558 cm^{-1} ($\nu_{\text{carboxyl anions}}$), 1400 cm^{-1} (ν_{CO}). UV/Vis bands (nm): 290, 511. XRD (2θ): 5.2300, 14.9200 and 19.5600].



Scheme 1



Scheme 2

The extraction of iron cyclohexanedicarboxylic acid in water and organic phases with pH effect

The aqueous solution of 5ml of 0.1N NaOH for pH=4 to 9.5 and solution of 1.3g (0.078mol) cyclohexanedicarboxylic acid in 10ml flask were stirred in ten separate flasks. Afterwards, 10ml of aqueous solution including 1mg/ml Fe²⁺ was added to this mixture, and after stirring for one hour at ambient temperature, the mixture was left for 24 hours. Composed solutions were separately placed in an extraction flask, and the amount of Fe²⁺ ions in organic and water phases was determined with atomic absorption with Unicam model 929, Aagrame (Yang *et al.* 1991, İnci 2002).

The percentage of the extraction was calculated with the following formula:

$$\% E = (\alpha + V_w / V_o) \cdot 100 \quad (1)$$

$$\alpha = C_o / C_w \quad (2)$$

Where % E= Extraction percentage, V_{org} = Volume of the organic phase (ml), V_w = volume of water phase, α = sharing constant, C_{org} = Fe²⁺ concentration in organic phase (mg/ml), C_w = Fe²⁺ concentration in water phase (mg/ml).

In all samples, 5ml 0.1N NaOH solution, 10ml FeSO₄ .7 H₂O (1mg/ml Fe²⁺) solution and 10ml ether solution in proportion 1.3g (3.7x10⁻³mol) iron dicarboxylic acid were used.

Biological activity procedure

The antibacterial and antifungal activities of the obtained complexes is tested by using agar well-diffusion susceptibility test (Shaukat *et al.* 1980) is carried out against Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*

Ehrenberg, *Staphylococcus aureus* Rosenbach) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* T. Escherich, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula) and the agar tube dilution protocol method (Kazmi *et al.* 1991) is applied against *Candida albicans* (Berkhout), *Candida glabrata* (Anderson) Mey & Yarrow and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc), respectively.

Results and Discussion

Synthesis and analyses

In the present study, the synthesis and the properties of a coordination compound of cyclohexanedicarboxylic acid and Fe (II) were studied. Two methods were employed for the synthesis and high yields were found to be fairly close with both methods. Spectroscopic methods showed the possible structure of iron dicarboxylic acid. Iron dicarboxylic acid is a brown solid. The solubility in different solvents and the results of the elemental analysis are given in Table 1 and Table 2. Elemental analysis determination is in good agreement with the general formula for the complex. The elemental analysis demonstrated that the obtained iron cyclohexanedicarboxylic acid has 1:1 stoichiometry. Complex is solid, insoluble in water but soluble in some organic solvents such as benzene, ether, Acetone, CCl₄ and CH₃COOH.

The FT-IR spectra of the complex (Figure 1) demonstrates two bands centered at 1593 and 1532cm⁻¹ are attributed to the (ν_{carboxyl anions}) vibrations. The band at about 2944cm⁻¹ is assigned to the absorption of the (ν_{CH}) vibrations and the (ν_{CO}) stretching of the complex are found in the frequency range about 1593 and 1532cm⁻¹. FT-IR bands of cyclohexanedicarboxylic acid (2878cm⁻¹ (ν_{CH}), 1738-1550cm⁻¹ (ν_{carboxyl anions}), 1475cm⁻¹ (ν_{CO})) are shifted to lower frequencies in the complex.

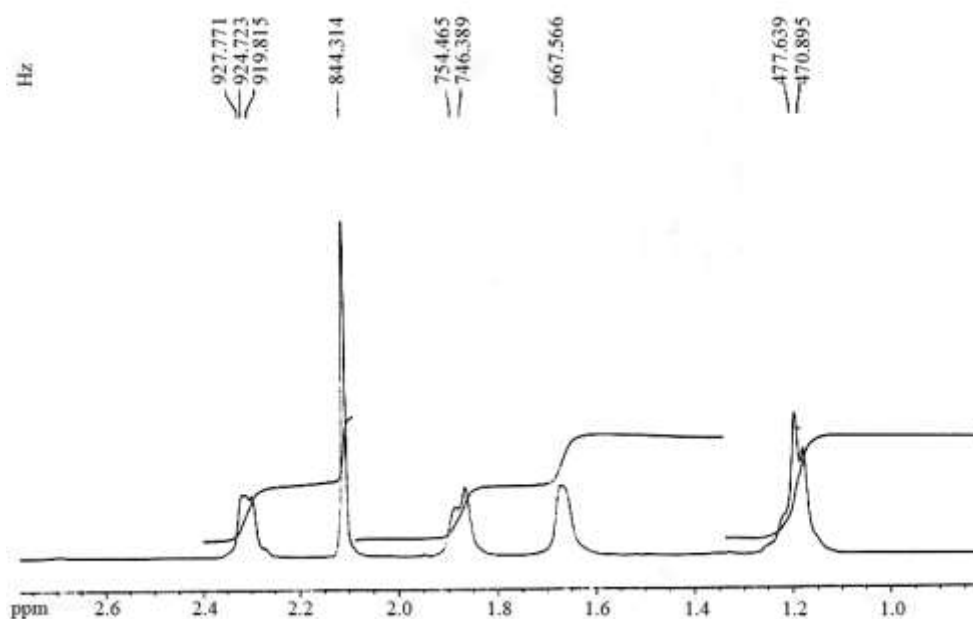


Figure 1. The FT-IR Spectrum of iron cyclohexanedicarboxylic acid

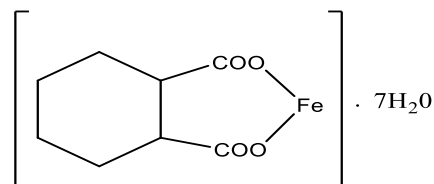
The UV/Visible spectrum of cyclohexanedicarboxylic acid molecule shows an absorption band at 302nm, whereas the complex demonstrates absorption bands at 290 and 511nm. The band at 290 which is attributed to $n-\pi^*$ and $\pi-\pi^*$ transitions, while the band at 511nm is caused by the electronic transitions both $n-\pi^*$ and $\pi-\pi^*$ and also charge transfer transition arising from π electron interactions between the metal and ligand that involves either a metal-to-ligand or ligand-to-metal electron transfer.

The XRD-Powder Pattern spectrum (Figure 2) of the complex is recorded by an X-Ray diffractometer and the unit cell parameters are calculated from 2θ values with the help of a computer. Powder XRD pattern of complex consist of three important peaks in the range $5-50^\circ(2\theta)$. The inter planar spacing (d) is calculated from the positions of intense peaks using Bragg's relationship. The 2θ values with maximum intensity of the peaks for Fe (II) complex were found to be 5.2300, 14.9200 and 19.5600 (2θ) which corresponds to d:16.97784, 5.93296 and 4.53476, respectively.

Thermogravimetric analysis determined the localization of the central cation in the complex molecule. Thermogravimetric analysis of iron cyclohexanedicarboxylic acid indicated two steps for decomposition and the amount of water in the composition of the molecule. Experimental thermolysis is given in Table 1 and Figure 3.

The decomposition of two carboxyl groups can be monitored from the thermogram. Up to 181°C , a water molecule leaves the compound, then between $306-724^\circ\text{C}$,

the organic component decomposes. The remaining compound over 724°C was determined as FeO. After these observations we concluded that the structure of iron cyclohexanedicarboxylic acid is $[\text{Fe}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4)] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The structural formula of the compound is shown below.



Scheme 3

Extraction results

Table 2 shows the extraction results. The graphics which show transition related to pH of the sharing constant (α) and extraction percentages (% E) of iron dicarboxylic acid for these values are given in Figure 4 and Figure 5. At the end of the experiment, most Fe^{2+} ions in the water phase at $\text{pH}=7.5$ passed into the organic phase, and the extraction percentage at this pH became $E = 96.5\%$. Extraction percentages decreased at pH values above 7.5 because of the transition from water phase to organic phase, (Figure 4).

Extraction experiments were repeated with benzene, benzole and carbon tetrachloride, apart from ether, and extraction yields were found to be close to 100 % between $\text{pH} = 7.5-8$ (Table 2). In this way, it was proven that in addition to ether, petroleum ether, benzole and CCl_4 solvents are also suitable extraction substances for iron cyclohexanedicarboxylic acid.

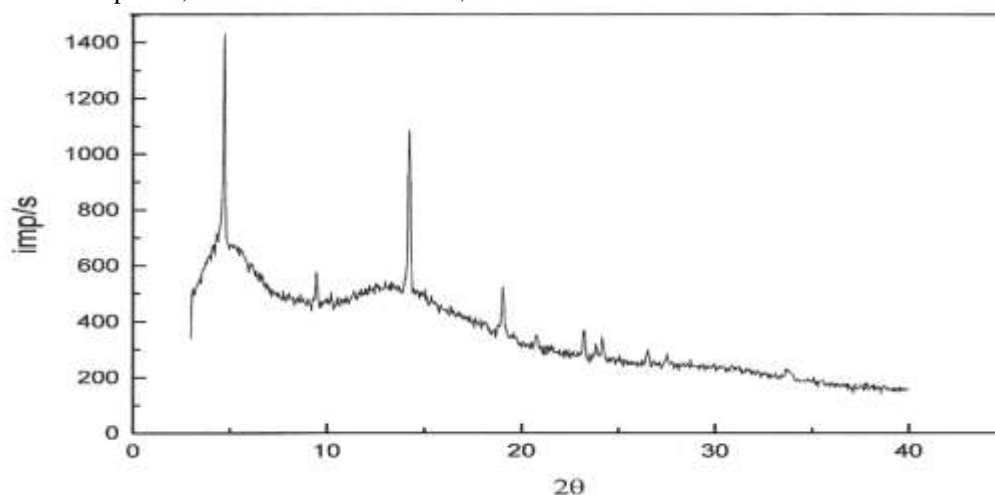


Figure 2. The XRD Spectrum of iron cyclohexanedicarboxylic acid

Table 1. Thermogravimetric analysis data of iron dicarboxylic acid

Compound	First step decomposition		Second step decomposition		FeO (%)
	T _b -T _e (°C)	Weight loss (%)	T _b -T _e (°C)	Weight loss (%)	
Iron Dicarboxylic acid	0-181	4.0	306-724	56.5	39.5

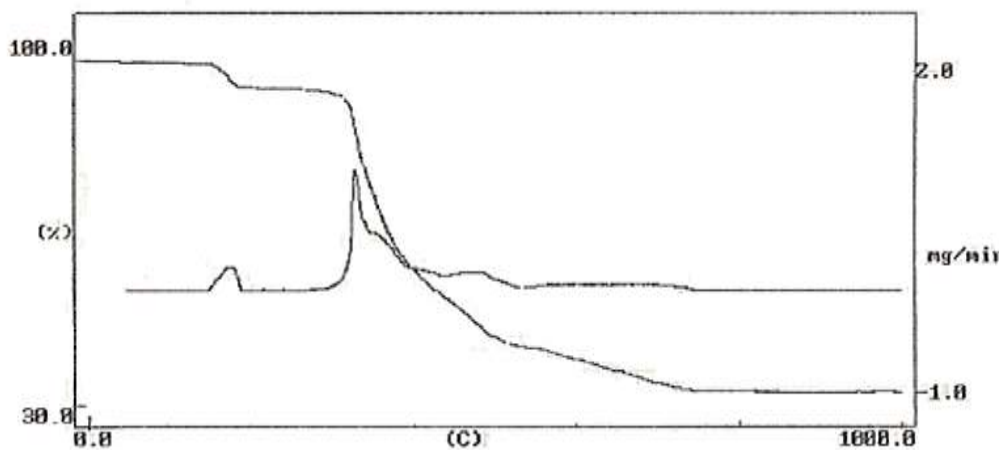


Figure 3. TG-DTA of iron cyclohexanedicarboxylic acid

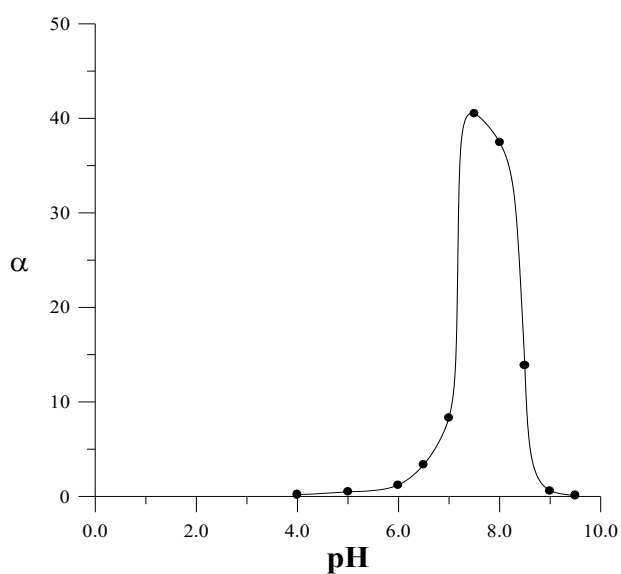


Figure 4. Transition of sharing constants of iron cyclohexanedicarboxylic acid with pH

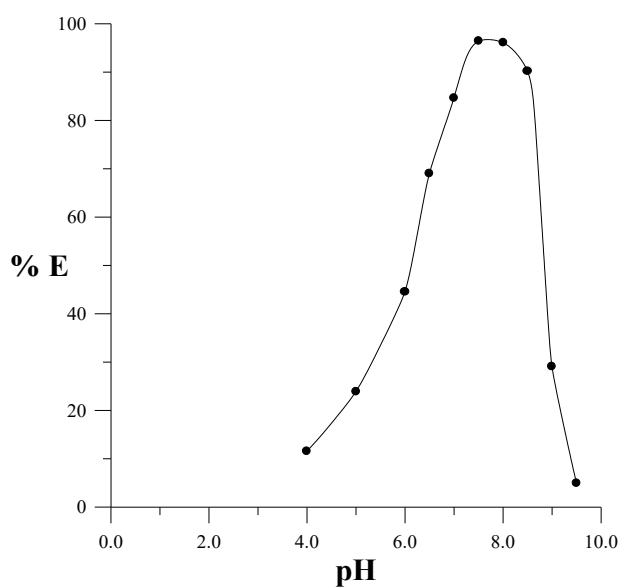


Figure 5. Transition of extraction percentages of iron cyclohexanedicarboxylic acid with pH

Table 2. Extraction of Fe²⁺ in different solvents from the aqueous solution

Sample	Organic Solvents (10ml)	pH	Water phase Cw (mg/ml) at the end of the extraction (1mg/ml Fe ²⁺)	Organic phase Co (mg/ml) at the end of the extraction (1mg/ml Fe ²⁺)	α	E (%)
1	Petrol. ether	7.9	0.003	0.095	31.60	95.40
2	Benzole	7.6	0.005	0.156	38.8	96.2
3	CCl ₄	7.7	0.002	0.173	86.5	98.3

Biological activity results

The results for the agar well-diffusion susceptibility tests showed that the iron complex potent antibacterial activity against Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* Ehrenberg, *Staphylococcus aureus* Rosenbach) and Gram-negative (*Escherichia coli* T. Escherich, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula) (Table 3).

Table 3. The antibacterial activities of the iron complex and standard

Bacteria ^a	Zone of inhibition (mm)	
	Iron Complex	Standard Drug ^b
<i>B. subtilis</i>	25	30
<i>S. aureus</i>	25	33
<i>E. coli</i>	20	32
<i>P. aeruginosa</i>	25	30

^aConcentration of sample is 3mg/ml DMSO, ^bInipenum, 10µg/disc

The results of the agar tube dilution protocol method showed that the iron complex has significant antifungal activity against *Candida albicans* (Berkhout), *Candida glabrata* (Anderson) Mey & Yarrow and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Table 4).

Table 4. The antifungal activities of the iron complex and standard.

Fungus	Inhibition (%)		
	Iron Complex	Standard Drug ^a	MIC ^b (10µg/mL)
<i>C. albicans</i>	75	Miconazole	110
<i>C. glabrata</i>	40	Miconazole	73
<i>F. solani</i>	70	Miconazole	110

^aIncubation temperature: 27°C, ^bConcentration of sample 200µg/mL of DMSO.

References

- Abell, P.I. 1957. Hunsdiecker reaction of silver salts of cis- and trans-1,2-cyclohexanedicarboxylic acid. *The Journal of Organic Chemistry*, 22 (7): 769-772.
- Altun, O., Türkyılmaz, M., Kaboglu, A., Huseyinova, G. & Feyizoğlu, A. 2010. Synthesis and properties of some basic metals and manganese salts cis-1,2-cyclohexanedicarboxylic acid and examination of their properties. *Asian Journal of Chemistry*, 22: 6443-6450.
- Battersby, A.R., Haszeldineand, R.N. & Haworth, R.D. 1968. *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*. Academic Press, London.
- Björkling, F., Boutelje, J., Gatenbeck, S., Hult, K. & Norin, T. 1985. Enzyme catalyzed hydrolysis of the diesters of cis- and trans-cyclohexanedicarboxylic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 21(1-2): 16-19.
- Chen, Z.H., Zhao, Y., Wang, P., Chen, S.S. & Sun, W.Y. 2014. Zinc (II) and cadmium (II) complexes with mixed 1,3-di (1H-imidazol-4-yl) benzene and cyclohexanedicarboxylate ligands: Synthesis, structure and property. *Polyhedron*, 67: 253-263.
- İnci, İ. 2002. Distribution of hydroxyl succinic acid between water and organic solutions of aliphatic tertiary amines. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 61: 289-293.
- Kamino, A., Koyano, H., Ariga, K., & Kunitake, T. 1996. Control of the Molecular Packing in Guanidinium

- Monolayers through Binding with Aqueous Polycarboxylates. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 69(12): 3619-3631.
8. Kazmi, S.U., Ali, S.N., Jamal, S.A. & Rehman, A.U. 1991. New bioactive compounds of plant origin. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2): 113-123.
 9. Koster, S., Koster, C.G., Benthem, R.A.T.M., Duursma, M.C., Boon, J.J. & Heerena, R.M.A. 2001. Structural characterization of hyperbranched polyesteramides: MSn and the origin of species. *International Journal of Mass Spectrometry*, 210: 591-602.
 10. March, J. 1985. *Advanced Organic Chemistry*. John Wiley Sons, New York.
 11. Reiznautt, Q.B., Garcia, I.T.S. & Samios, D. 2009. Oligoesters and polyesters produced by the curing of sunflower oil epoxidized biodiesel with cis-cyclohexane dicarboxylic anhydride: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering: C.*, 29: 2302-2313.
 12. Shaukat, S.S., Khan, N.A. & Ahmed, F. 1980. Herbicide influence on geminationans seedling growth of *Vigna mugno* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) Wilezek, *Pakistan Journal of Botany*, 12: 97-106.
 13. Yang, S.T., White, S.A. & Hsu, S.T. 1991. Extraction of carboxylic acids with tertiary and quaternary amines: effect of pH. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 30: 1335-1342.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ROSMARINIC ACID ISOLATED FROM *Prunella vulgaris* L. AND *Prunella grandiflora* L. IN DIFFERENT TUMOR CELLS

Saliha ŞAHİN^{1*}, Gülçin TEZCAN², Cevdet DEMİR¹, Berrin TUNCA², Gülşah ÇEÇENER²,
Ünal EGELİ²

¹ Uludağ University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry, 16059, Bursa

² Uludağ University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, 16059, Bursa

*Corresponding author: e-mail: salihabilgi@uludag.edu.tr

Received (Alınış): 16 November 2016, Accepted (Kabul): 27 February 2017, Online First (Erken Görünüm): 27 March 2017, Published (Basım): 15 June 2017

Abstract: Rosmarinic acid was isolated from ethanol extractions obtained from *Prunella grandiflora* L. and *P. vulgaris* L. The total phenolic content of ethanol fractions during isolation was determined by the Folin-Ciocalteu method. The cytotoxic doses of the isolated rosmarinic acid were determined by WST-1 (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) cell proliferation assay. A 10-60ng cytotoxic dose was determined for pancreas (PANC-1), prostate (PC-3), colon (HT-29) and breast (MDA-MB 436) cancers and GBM (T98G) cell lines and lymphatic tissues. 24 and 48h incubation periods were applied during dose determinations. An antiproliferative effect was observed at the end of 48h incubation period with 50ng rosmarinic acid treatment in PC3 cell line and with 60ng treatment in PANC-1, HT-29, MDA-MB 436 and T98G cell lines. No cytotoxic activity of rosmarinic acid was observed in non-tumor cells.

Key words: *Prunella* L., isolation, rosmarinic acid, antiproliferative, cytotoxic activity.

Prunella vulgaris L. ve *Prunella grandiflora* L.'den Saflaştırılan Rosmarinik Asitin Farklı Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi

Özet: Bu çalışmada rosmarinik asit bileşiği, *Prunella grandiflora* L. ve *P. vulgaris* L. türlerinden elde edilen etanol ekstraktlarından saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sırasında elde edilen metanol fraksiyonlarının toplam fenol içeriği Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir. *Prunella* L. türlerinden saflaştırılan rosmarinik asitin farklı kanser hücreleri üzerinde WST-1 (Roche Applied Sciences, Mannheim, Almanya) yöntemiyle sitotoksik doz çalışmaları yapılmıştır. Buna göre pankreas (PANC-1), prostat (PC-3), kolon (HT-29) ve meme (MDA-MB 436) kanserleri ile GBM (T98G) hücre hatları ve lenf dokularında 10-60ng arasında sitotoksik doz belirlenmiştir. Sitotoksik doz belirleme çalışmaları için 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri çalışılmıştır. 48 saat inkübasyon süresi sonunda PC3 hücre hattı için 50ng ve PANC-1, HT-29, MDA-MB 436 ve T98G hücre hatları için 60ng rosmarinik asit uygulamasında antiproliferatif etki gözlenmiştir. Sağlıklı hücrelerde rosmarinik asitin sitotoksik etkisi gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: *Prunella* L., izolasyon, rosmarinik asit, antiproliferatif, sitotoksik aktivite.

Introduction

Phenolic compounds are natural compounds in aromatic and herbal plants. The main properties of such compounds are their antioxidant and radical scavenging activities (Baricevic *et al.* 2001, Petersen & Simmonds 2003). These compounds also have biological properties such as fungistatic, cytotoxic, antibacterial and antiviral activities.

Prunella L. has been used as a herbal in traditional medicine applications for several years. It has many biological effects such as anti-inflammatory and antimicrobial activities (Zdařilová *et al.* 2009). *Prunella* species also exhibit anti-growth effects on different cancer types (Feng *et al.* 2010, Woo *et al.* 2011). The main

source of antioxidant activity in *Lamiaceae* is rosmarinic acid (Kim & Lee 2004). For instance, Yeşil-Çelikleş *et al.* (2010) demonstrated that rosmarinic acid derived from the leaves of *Rosmarinus officinalis* L. showed anticancer activity of n lung, prostate, hepatocellular, myeloid leukemia and breast cancers. The antiproliferative effect of phenolics may differ depending on the species (Feng *et al.* 2010), i.e. although the inhibitor effect of rosmarinic acid from *R. officinalis* was demonstrated in different cancer cell lines, it has not been determined in *Prunella* species.

We aimed in the present study to isolate rosmarinic acid in ethanolic extracts of *P. vulgaris* and *P. grandiflora*

in order to demonstrate its antiproliferative effects on pancreas, prostate, colorectal and breast cancers and GBM cell lines.

Materials and Methods

Rosmarinic acid, Folin-Ciocalteu reagent and Sephadex LH-20 were supplied from Sigma–Aldrich. Methanol, ethanol, acetonitrile and formic acid were supplied from Merck. All cell lines were provided by the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, USA). Penicillin, Fetal Bovine Serum (FBS), Streptomycin, RPMI 1640, Sodium Pyruvate (BIOCHROME, Berlin, Germany), Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 containing L-glutamin (DMEM-F12, HyClone, Utah, USA), and Hitopaque–1077 (Sigma-Aldrich, Chemiegmbh, Steinheim, Germany) and Phytohemagglutinin (PHA; Gibco-Invitrogen, Denmark) were used for maintenance of cancer cell lines and lymphocytes.

Isolation of rosmarinic acid

Prunella species were collected from in Turkey (Bursa, Balıkesir, Eskişehir and Antalya) from June to July in 2009. After dried at room temperature, the samples were stored at 4°C. The parts of *P. grandiflora* and *P. vulgaris* samples (10g) were separately mixed with ethanol at room temperature in dark for 5h under magnetic stirrer. The separated ethanolic fraction (15mL) was isolation using Sephadex LH-20 column chromatography. Standard rosmarinic acid was dissolved in methanol for chromatographic analysis. Because of this reason, the extracts were eluted with methanol from column.

Folin-Ciocalteu method

Folin method (Şahin et al. 2014, Singleton et al. 1999) was used for determining the total phenolic contents of *Prunella* fractions by UV/vis spectrometer (Varian Cary 50 Conc, Australia) equipped with 10mm quartz cuvettes.

Chromatographic analysis

Rosmarinic acid was determined in *Prunella* samples by HPLC-DAD. The results of our previous study were followed for chromatographic analysis of rosmarinic acid in *Prunella* fractions (Şahin et al. 2014).

Determination of the effect of fractions on cytotoxicity and cell viability of cancer cell lines

Five human cancer cell lines, T98G; GBM, PANC-1; pancreas, PC-3; prostate, HT-29; colorectal and MDA-MB 436; breast were grown in DMEM-F12 containing L-glutamine supplemented with 10% FBS, 100µg mL⁻¹ streptomycin, 1mM sodium pyruvate and 100U mL⁻¹ penicillin in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C.

Human peripheral blood lymphocytes were used for analyzing the cytotoxic effect of rosmarinic acid fractions in non-tumor cells. Five milliliter of heparinized total blood was obtained from a healthy, 30 years old non-smoking female volunteer with her complete informed consent. Human mononuclear lymphocytes were isolated with density gradient centrifugation using Hitopaque–1077 reagent and washed twice. Lymphocytes

(3 x 10⁵/well) were added to 5ml of medium containing 78% RPMI 1640, 20% FBS, penicillin and streptomycin, and 2% phytohemagglutinin for stimulation in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. The negative control group was obtained from an untreated culture of each cell lines and lymphocytes and the positive control from cells treated with 30mM H₂O₂.

The cytotoxicity of rosmarinic acid derived from *Prunella grandiflora* L. and *Prunella vulgaris* L. with doses ranging from 10 to 60ng in T98G, PANC-1, PC-3, HT-29 and MDA-MB 436 cancer cell lines and lymphocytes were assayed using a cell proliferation kit according to our previous study (Tezcan et al. 2015).

Results

Determination of rosmarinic acid in fractions

The ethanol extracts of *Prunella* L. species were purified by column chromatography and eluting in two fractions for *P. grandiflora* and *P. vulgaris* (Fig. 1a, b). The methanolic fractions were monitored at 280nm and analyzed by HPLC-DAD.

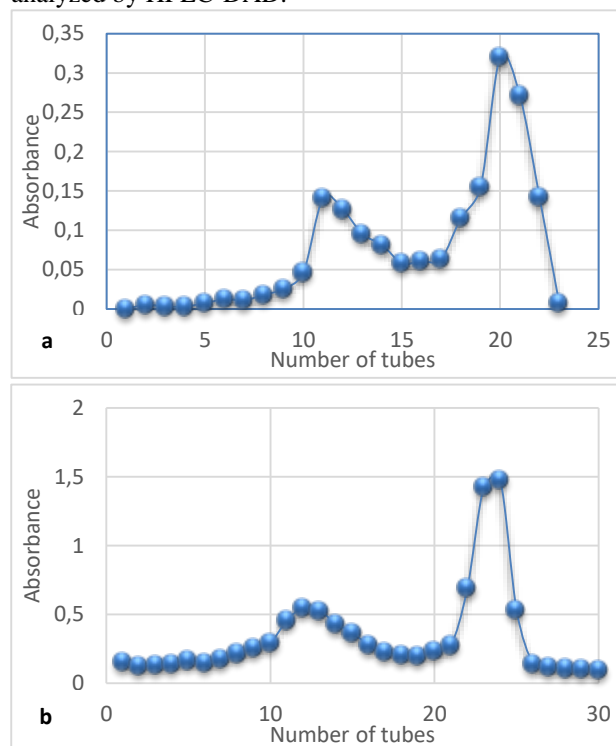


Fig. 1. Eluates following Sephadex LH-20 column chromatography of diluted fraction of (a) *P. grandiflora* at 280nm (Fraction 1: 1-15 tube, fraction 2: 16-23 tube), (b) *P. vulgaris* at 280nm (Fraction 1: 1-17 tube, fraction 2: 18-30 tube).

Rosmarinic acid was only determined in methanolic fraction 2 of *Prunella* species. There was only one fraction for *P. grandiflora* L. (Fig. 2a) and *P. vulgaris* L. (Fig. 2b) at 280nm in Fraction 2. The results showed that 8.7 and 15.3mg of rosmarinic acid were isolated from *P. grandiflora* and *P. vulgaris*, respectively.

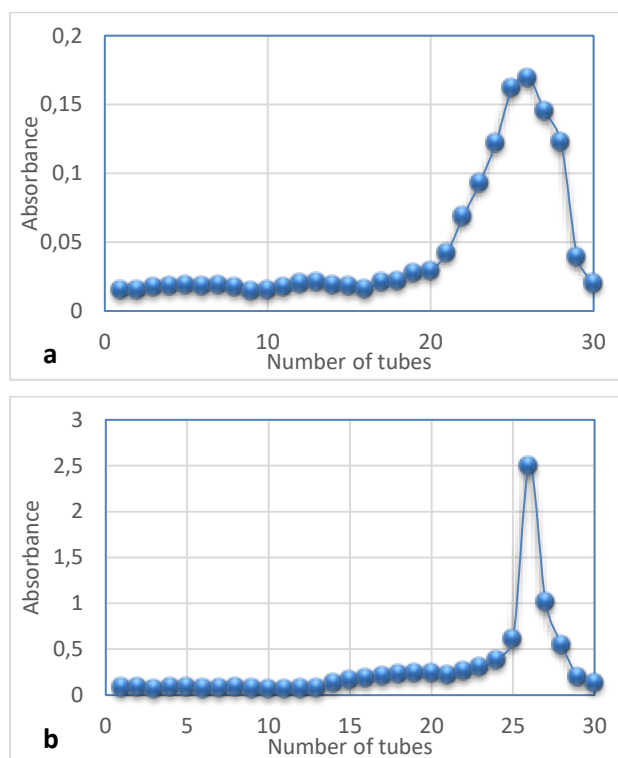
The total phenolic contents of *P. grandiflora* and *P. vulgaris* were found as 24.11 and 24.10mg/g as deduced from dried plants in fraction 2 (Table 1).

Table 1. Total phenolic content of fractions (mg GAE g⁻¹ dried plant)

Sample		<i>P. grandiflora</i>	<i>P. vulgaris</i>
Total phenolic content	Fraction 1	9.03±0.18	8.21±0.01
	Fraction 2	24.11±1.33	24.10±2.72

Cytotoxic effect of rosmarinic acid on cancer cell lines

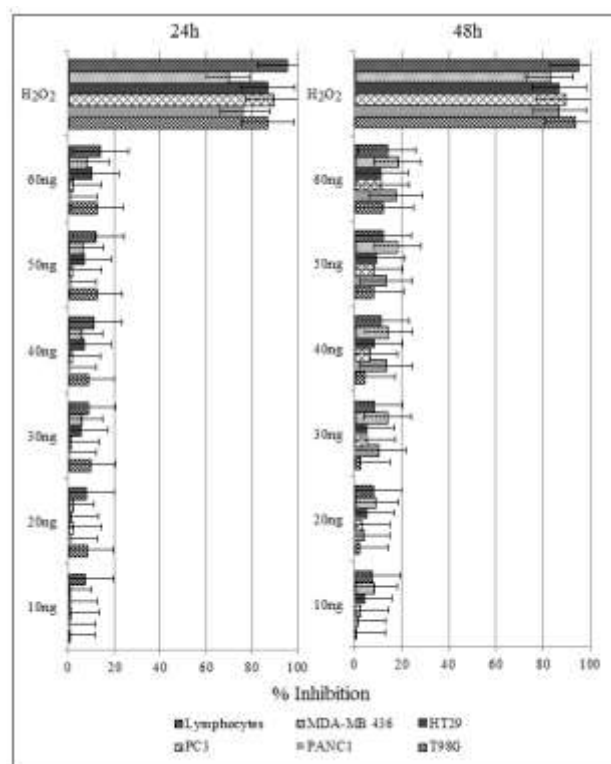
T98G, HT-29, PANC-1, PC-3, MDA-MB 436 cells and lymphocytes were seeded at a density of 2×10^4 cells well⁻¹ in 96-well plates. Cell proliferation was assessed using the WST-1 assay after 24 and 48h of exposure to rosmarinic acid doses ranging from 10 to 60ng. After treatment with rosmarinic acid of *P. grandiflora*, very low cytotoxic effects were noted in all five cancer cell lines. The percentage decrease was 12.2% in the proliferation of T98G, 17.5% in PANC-1, 11.2% in PC-3, 11.5% in HT-29 and 18.4% in MDA-MB 436 at 60ng rosmarinic acid of *P. grandiflora* extract (Fig. 3). When these cells were treated with H₂O₂, 93.2, 86.9, 89.2, 86.9 and 82.8% reduction in proliferation was observed at 48h, respectively.

**Fig. 2.** Eluates following Sephadex LH-20 column chromatography of diluted fraction 2 of (a) *P. grandiflora*, (b) *P. vulgaris* at 280nm.

After treatment with rosmarinic acid of *P. vulgaris*, dose- and time-dependent reductions were observed in all cell lines (Fig. 4).

The inhibitory concentrations were identified within 48h for all cell lines. After treatment with 60ng rosmarinic acid of *P. vulgaris*, while 27.4% of PANC1 cells and 41.3% of T98G cells were inhibited, the inhibition rate

was up to approximately 50% for HT-29 and MDA-MB 436 cells. HT-29, MDA-MB 436 and PC3 are adenocarcinoma cells of colon, breast and prostate which are defined as neoplasia of epithelial tissues. Thus, 60ng rosmarinic acid of *P. vulgaris* caused similar inhibitory effects on these cell lines. However, the pancreatic epithelioid carcinomas and GBM are more aggressive tumor types than adenocarcinomas. So, the inhibition rate of 60ng rosmarinic acid derived from *P. vulgaris* was lower in PANC1 and GBM cells than the other tumor cell lines. The percentage decreases in the proliferation of cells are shown in Table 2. In addition, negligible cytotoxic effects were determined when the concentrations were tested on activated fresh human mononuclear lymphocytes, indicating that rosmarinic acid of *P. vulgaris* preferentially inhibits tumor cells. When lymphocytes were treated with 60ng rosmarinic acid of *P. vulgaris* for 48h, 5.9% reduction was observed in proliferation, the reduction in proliferation was 73.6%.

**Fig. 3.** Inhibition of cell viability at different rosmarinic acid of *P. grandiflora* concentrations in 24 and 48h.**Discussion**

Rosmarinic acid is the main phenolic compound in *Prunella* L. species. Therefore, it is also better to demonstrate the total phenolic contents of *Prunella* extracts. It can be seen that most of the rosmarinic acid is isolated in first fraction and other phenolic compounds were eluted in second fraction. HPLC analysis showed that the amount of rosmarinic acid in *P. vulgaris* was higher than the methanol extract of *Nepeta menthoides* Boiss. & Buhse (Hadi *et al.* 2017).

The efficacy of *Prunella* extracts from different regions in China in prevention and treatment of lung

cancer was evaluated (Feng *et al.* 2010). The researchers defined the highest antiproliferative activities in *P. vulgaris* from Bozhou and *P. asiatica* Nakai from Nanjing. Rosmarinic acid content in *P. vulgaris* from Bozhou was 1.32mg/g (Feng *et al.* 2010). While 8.7mg of rosmarinic acid was isolated from *P. grandiflora*, a 15.3mg was extracted from *P. vulgaris*. The efficacy of rosmarinic acid derived from these two species on cancer cell lines was different due to the different collecting localities. Similar results were obtained as Feng *et al.* (2010) for the inhibitory effect of rosmarinic acid derived from *P. vulgaris* on cancer cell proliferation. The variations in the efficacy of *Prunella* species could be related to the existence of differences in genes and rosmarinic acid content.

The inhibitory effect of rosmarinic acid derived from the leaves of *Rosmarinus officinalis* on DU-145 (human, prostate, carcinoma), K-562 (human chronic myeloid leukemia), NCI-H82 (human, small cell lung, carcinoma), Hep-3B (liver, hepatocellular, human, carcinoma, black), MDA-MB-231 (human, breast, adenocarcinoma, breast, human), MCF-7 (adenocarcinoma, breast, human) and PC-3 (human, adenocarcinoma, prostate) was investigated (Yeşil-Çeliktaş *et al.* 2010). Proliferative effect of rosmarinic acid was observed rather than cytotoxic activity in almost all cell lines at 50µg/mL (140µM) in MTT assay. In this study, inhibitor activity of rosmarinic acid derived from *P. vulgaris* was observed in cell proliferation, but the same effect was not observed in rosmarinic acid of *P. grandiflora*. The variation of inhibitory effect of rosmarinic acid could be explained by the plant variation and the contents of other phenolic compounds. Similar results have been observed for quercetin from onions, apples and tea as different phenolic compound sources (Hollman *et al.* 1997). The antiproliferative effect of rosmarinic acid on cancer cells might vary with the variation of plant origin. The cytotoxic effect of rosmarinic acid was determined in Leukemia ARH-77 cell line by MTT assay (Canturk *et al.* 2016). Rosmarinic acid showed cytotoxic effects at 50mM concentration. Also the cytotoxic effect of rosmarinic acid was showed at a concentration of 1000µg/mL on human tumor cells (Júnior *et al.* 2016). According to the results reported so far within similar studies concerning rosmarinic acid, the cytotoxic activities of rosmarinic acid are higher than the values reported in our present study.

Table 2. The percentage decreases in proliferation of cancer cell lines and lymphocytes after treatment with doses of rosmarinic acid isolated from *P. vulgaris*.

Cell Lines	Cell Type	Doses (ng)	% Inhibition	
			24h	48h
T98G	Glioblastoma multiforme	60	20.1	41.3
PANC1	Pancreas epithelioid carcinoma		15.1	27.4
PC3	Prostate grade IV. adenocarcinoma	50	14.8	52.4
HT-29	Colorectal adenocarcinoma	60	18.3	48.7
MDA-MB 436	Breast adenocarcinoma		32.1	50.8
Lymphocytes	Non-tumor cells		8.2	5.9

Conclusion

Our results showed that *Prunella* fractions can be used as antioxidative and pharmaceutical supplement. Rosmarinic acid derived from *P. vulgaris* could be a good candidate to cause cell death in prostate, pancreas, colorectal, breast cancers and GBM cells. No cytotoxic effect was observed for rosmarinic acid of *P. grandiflora*. On the other hand, 60ng of rosmarinic acid derived from *P. vulgaris* treatment caused antiproliferative effect on prostate cancer cell line (PC3) and 50ng of rosmarinic acid derived from *P. vulgaris* on pancreas (PANC-1), colorectal (HT-29), breast (MDA-MB 436) cancer and GBM (T98G) cell lines. The molecular mechanism of the cytotoxic activity of rosmarinic acid of *P. vulgaris* requires future clinical applications. The present findings could be used as a guidance to formulate a product from these species and also to serve as a reference point for future research.

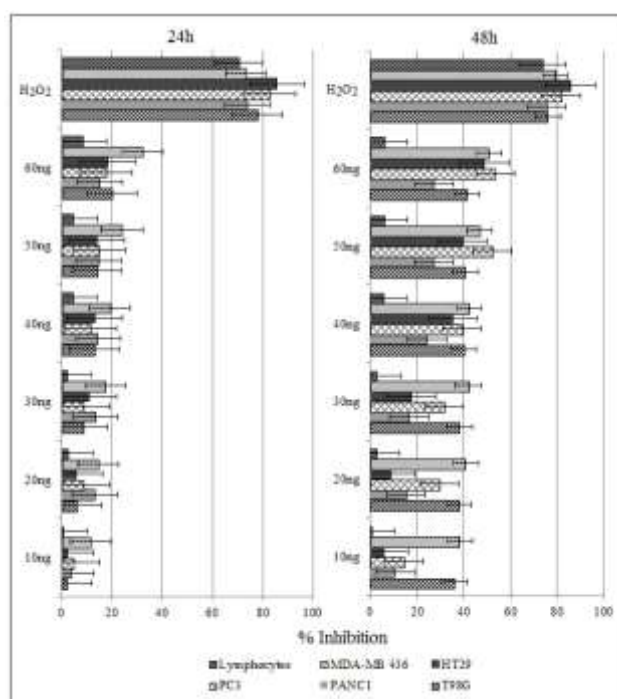


Fig. 4. Inhibition of cell viability at different rosmarinic acid of *P. vulgaris* concentrations in 24 and 48h.

References

1. Baricevic, D., Sosa, S., Loggia, R.D., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A. & Zupancic, A. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 75: 125-132.
2. Canturk, Z., Dikmen, M., Artagan, O., Ozarda, M.G. & Ozturk, N. Cytotoxic Effects of Resveratrol, Rutin and Rosmarinic Acid on ARH-77 Human (Multiple Myeloma) Cell Line. 2016. *Natural Product Communications*, 11(10): 1441-1440.
3. Feng, L., Jia, X.B., Jiang, J., Zhu, M.M., Chen, Y., Tan, X.B. & Shi, F. 2010. Combination of active components enhances the efficacy of *Prunella* in prevention and treatment of lung cancer. *Molecules*, 15(11): 7893-7906.
4. Hadi, N., Sefidkon, F., Shojaeiyan, A., Siler, B., Jafari, A.-A., Anicic, N. & Mistic, D. 2017. Phenolics' composition in four endemic *Nepeta* species from Iran cultivated under experimental field conditions: The possibility of the exploitation of *Nepeta* germplasm. *Industrial Crops and Products*, 95: 475-484.
5. Hollman, P.C., van Trijp, J.M., Buysman, M.N., van der Gaag, M.S., Mengelers, M.J., de Vries, J.H. & Katan, M.B. 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 24: 418(1-2), 152-156.
6. Júnior, J.T.C., Morais, S.M., Gomez, C.V., Molas, C.C., Rolon, M., Boligon, A.A., Ahtayde, M.L., Oliveira, C.D.M., Tintino, S.R. & Douglas, M.C.H. 2016. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast "Cerrado". *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23: 434-440.
7. Kim, D.-O. & Lee, C.Y. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4): 253-273.
8. Petersen, M. & Simmonds, M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121-125.
9. Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
10. Şahin, S., Arı, F., Demir, C. & Ulukaya, E. 2014. Isolation of major phenolic compounds from the extracts of *Prunella* L. species grown in Turkey and their antioxidant and cytotoxic activities. *Journal of Food Biochemistry*, 38: 248-257.
11. Tezcan, G., Tunca, B., Bekar, A., Yalçın, M., Sahin, S., Budak, F., Çeçener, G., Egelı, Ü., Demir, C., Güvenç, G., Yılmaz, G., Erkan, L.G., Malyer, H., Taşkapılıoğlu, M.Ö., Evrensel, A. & Bilir, A. 2015. *Ficus carica* Latex Prevents Invasion Through Induction of Let-7d Expression in GBM Cell Lines. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(2):175-87.
12. Woo, H.J., Jun Do, Y., Lee, J.Y., Woo, M.H., Yang, C.H. & Kim, Y.H. 2011. Apoptogenic activity of 2*α*,3*α*-dihydroxyurs-12-ene-28-oic acid from *Prunella vulgaris* var. *lilacina* is mediated via mitochondria-dependent activation of caspase cascade regulated by Bcl-2 in human acute leukemia Jurkat T cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(3): 626-635.
13. Yeşil-Çelıktaş, O., Sevimli, C., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F. 2010. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Human Nutrition*, 65(2): 158-163.
14. Zdařilová, A., Svobodová, A., Šimánek, V. & Ulrichová, J. 2009. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid suppress lipopolysaccharide-induced alteration in human gingival fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 23: 386-392.

MACROFUNGI DETERMINED IN UZUNGÖL NATURE PARK (TRABZON)

İlgaz AKATA^{1*}, Yasin UZUN²

¹Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey

²Karamanoğlu Mehmetbey University, Kamil Özdağ Science Faculty, Department of Biology, Karaman, Turkey

*Corresponding author: akata@science.ankara.edu.tr

Received (Alınış): 28 February 2017, Accepted (Kabul): 20 March 2017, Online First (Erken Görünüm): 4 April 2017, Published (Basım): 15 June 2017

Abstract: In the present study, macrofungi samples collected from Uzungöl Nature Park (Trabzon) between 2011 and 2013 were identified and classified. After field and laboratory studies, a total of 205 macrofungi species were determined. A list of 212 species, by including the previously reported 7 species in the research area, belonging to 129 genera and 64 families within 2 divisions were given. Forty-six species were determined to belong to *Ascomycota* and 166 to *Basidiomycota*.

Key words: Biodiversity, macrofungi, Uzungöl Nature Park, Turkey.

Uzungöl Tabiat Parkı (Trabzon)'ndan Belirlenen Makrofunguslar

Özet: Bu çalışmada, Uzungöl Tabiat Parkı (Trabzon)'ndan 2011 ve 2013 yılları arasında toplanan makrofungus örnekleri teşhis edilmiş ve sınıflandırılmıştır. Arazi ve laboratuvar çalışmaları sonrasında 205 makromantar türü tespit edilmiştir. Daha önceden araştırma alanından rapor edilmiş 7 tür de dâhil olmak üzere, toplam 2 bölüm içinde yer alan 64 familya ve 129 cinse ait toplam 212 tür verilmiştir. Tespit edilen türlerden 46'sı *Ascomycota*, 166'sı *Basidiomycota* bölümüne mensuptur.

Anahtar kelimeler: Biyoçeşitlilik, makromantarlar, Uzungöl Tabiat Parkı, Türkiye.

Introduction

The current available data on macrofungal diversity in Turkey is based on studies dating back to more than 100 years ago. Studies concerning macrofungi showed a considerable increase in number over the last decade and a general overview of the published data was given in Sesli and Denchev (2008). More recently, new studies on macrofungal diversity of Turkey yielded additional data (Akata *et al.* 2016a,b, Allı *et al.* 2016, Demirel *et al.* 2016, Doğan & Kurt 2016, Doğan & Öztürk 2015, Dülger & Akata 2016, Sesli *et al.* 2016). Although a number of mycological investigations in and around the current study area (Uzungöl Nature Park) were performed (Akata 2012a,b, Akata & Doğan 2015, Akata & Kaya 2012, 2013a,b, Akata *et al.* 2011, 2012, 2014, 2016a,b, Baydar & Sesli 1994, Kaya *et al.* 2013, Sesli 1993, Sesli *et al.* 2016 and Uzun *et al.* 2014, 2015), no detailed taxonomic investigation on macrofungal diversity here was carried out.

Uzungöl is a mountain lake situated in Eastern Black Sea region of Turkey at an elevation of approximately 1000m asl. The lake is 105km far to Trabzon Province and 25km to Çaykara district center. The part of the lake area covering 1625 hectares was announced as Nature Park in 1989 considering of its rich biodiversity, wild life and beautiful landscape (Figure 1).

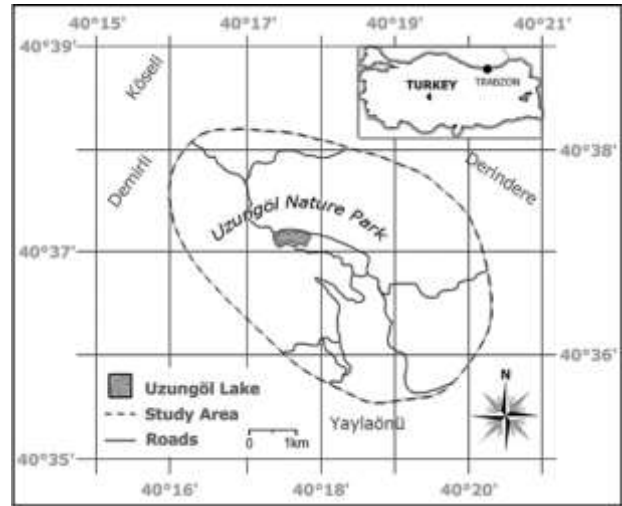


Figure 1. Map showing the study area around Uzungöl Nature Park. The borders of the sampled area was shown with dashed lines.

The forest vegetation of the Nature Park is primarily dominated by spruce (*Picea orientalis* L.), sometimes forming mixed stands with beech (*Fagus orientalis* Lipsky), fir (*Abies nordmanniana* (Stev.) Spach), alder (*Alnus glutinosa* L.), Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), and several bushes such as hazelnut (*Corylus avellana* L.),

common box (*Buxus sempervirens* L.) and common rhododendron (*Rhododendron ponticum* L.) are also present (Arikan *et al.* 2007, Atasoy 2010).

The region where the study lake is located has a typical oceanic climate with plentiful precipitation. The annual average temperature is 8°C and the rainfall is 926.4mm. Winters are snowy and cold with a lowest average temperature value of 0.1°C, in February. Summers are warm, humid and the average maximum temperature is 15.38°C, in July (Verep *et al.* 2002).

The purpose of the current study is to determine the macrofungal diversity of Uzungöl Nature Park and to make a contribution to the mycobiota of Turkey.

Materials and Methods

The fungal samples were collected between 2011 and 2013 from 40 localities inside the boundaries of Uzungöl Nature Park (Table 1). Ecological and morphological characteristics of the samples were recorded in the field

and all samples were photographed in their natural environment. Samples were brought to herbarium for their general macroscopic and microscopic examinations. Identifications of the samples were performed according to Bas *et al.* (1988, 1990, 1995), Boertmann (1996), Breitenbach & Kränzlin (1984, 1986, 1991, 1995, 2000), Fan *et al.* (1994), Hansen & Knudsen (1992, 1997, 2000), Kränzlin (2005), Kuyper (1986), Medardi (2006), Pegler *et al.* (1997), Ryvarden & Gilbertson (1993) and Sunhede (1989). The identified samples are deposited in Ankara University Herbarium (ANK).

Results

The identifications of the collected samples revealed presence of 205 macrofungal taxa in the studied area. The list of the identified species were given below with their locality, habitat, altitude, geographical coordinate, collection date and accession number details. Names of all identified taxa were given in the list according to Cannon & Kirk (2007) and Kirk *et al.* (2008).

Table 1. Coordinates, altitudes and positions of the sampled localities with respect to the lake.

Locality No	Locations of the sampling localities with respect to the lake as the reference point	Coordinates	Altitudes (m)
1	North-west of the Lake	40° 38' 10" N - 40° 16' 17" E	920
2	North-west of the Lake	40° 37' 26" N - 40° 16' 57" E	1100
3	North-west of the Lake	40° 37' 08" N - 40° 16' 17" E	1600
4	South-west of the Lake	40° 36' 59" N - 40° 17' 11" E	1300
5	South of the Lake	40° 36' 44" N - 40° 17' 49" E	1540
6	South-east of the Lake	40° 36' 30" N - 40° 18' 20" E	1580
7	South-east of the Lake	40° 36' 23" N - 40° 18' 07" E	1835
8	South-east of the Lake	40° 36' 15" N - 40° 18' 31" E	1470
9	South-east of the Lake	40° 35' 56" N - 40° 18' 27" E	1690
10	South-east of the Lake	40° 35' 38" N - 40° 18' 26" E	1710
11	North-east of the Lake	40° 37' 52" N - 40° 18' 24" E	1620
12	North of the Lake	40° 37' 50" N - 40° 17' 30" E	1450
13	North of the Lake	40° 37' 21" N - 40° 17' 33" E	1290
14	North-east of the Lake	40° 37' 24" N - 40° 18' 04" E	1400
15	North-east of the Lake	40° 37' 17" N - 40° 18' 31" E	1360
16	North of the Lake	40° 38' 10" N - 40° 17' 13" E	1350
17	North of the Lake	40° 37' 38" N - 40° 18' 45" E	1800
18	North-west of the Lake	40° 38' 28" N - 40° 16' 33" E	1230
19	West of the Lake	40° 38' 35" N - 40° 16' 12" E	890
20	North-west of the Lake	40° 37' 54" N - 40° 16' 12" E	1005
21	West of the Lake	40° 37' 06" N - 40° 16' 26" E	1490
22	South of the Lake	40° 36' 29" N - 40° 17' 34" E	1500
23	North-east of the Lake	40° 37' 11" N - 40° 18' 24" E	1200
24	East of the Lake	40° 37' 00" N - 40° 18' 41" E	1160
25	South of the Lake	40° 36' 52" N - 40° 17' 36" E	1260
26	East of the Lake	40° 36' 57" N - 40° 18' 02" E	1290
27	East of the Lake	40° 36' 35" N - 40° 18' 31" E	1440
28	East of the Lake	40° 36' 36" N - 40° 18' 04" E	1700
29	North-east of the Lake	40° 37' 10" N - 40° 18' 44" E	1340
30	North-east of the Lake	40° 37' 13" N - 40° 18' 53" E	1400
31	East of the Lake	40° 36' 56" N - 40° 18' 52" E	1290
32	North-west of the Lake	40° 37' 06" N - 40° 16' 43" E	1295
33	North-west of the Lake	40° 36' 55" N - 40° 16' 32" E	1500
34	North-west of the Lake	40° 37' 00" N - 40° 16' 28" E	1540
35	West of the Lake	40° 36' 56" N - 40° 16' 46" E	1380
36	West of the Lake	40° 36' 49" N - 40° 16' 34" E	1370
37	North of the Lake	40° 38' 15" N - 40° 17' 46" E	1560
38	North of the Lake	40° 37' 38" N - 40° 17' 54" E	1650
39	North of the Lake	40° 37' 14" N - 40° 17' 50" E	1180
40	East of the Lake	40° 36' 45" N - 40° 19' 07" E	1430

Pylum ASCOMYCOTA

Family *Caloscyphaceae*

Caloscypha fulgens (Pers.) Boud.: Locality 7, spruce and beech mixed forest, 16.05.2013, Akata & Yuzun 1670.

Family *Chlorociboriaceae*

Chlorociboria aeruginosa (Oeder) Seaver ex C.S. Ramamurthi, Korf & L.R. Batra: Locality 14, on beech branch, 01.10.2011, Akata & Yuzun 953.

Family *Cudoniaceae*

Cudonia circinans (Pers.) Fr.: Locality 17, spruce forest, 06.09.2011, Akata & Yuzun 889.

Spathularia flavida Pers.: Locality 10, spruce forest, 25.09.2011, Akata & Yuzun 947.

Spathulariopsis velutipes (Cooke & Farl. ex Cooke) Maas Geest. (Akata & Kaya 2013a).

Family *Diatrypaceae*

Diatrype disciformis (Hoffm.) Fr.: Locality 35, on beech branch, 17.10.2012, Akata & Yuzun 1406.

Family *Geoglossaceae*

Trichoglossum hirsutum (Pers.) Boud. (Akata & Kaya 2013a).

Family *Helotiaceae*

Ascocoryne cylichnium (Tul.) Korf.: Locality 28, 19.09.2012, on beech stump, Akata & Yuzun 1202.

Bisporella citrina (Batsch) Korf & S.E. Carp.: Locality 5, 10.09.2011, on beech stump, Akata & Yuzun 910.

Cyathicula coronata (Bull.) Rehm (Akata 2012a).

Cyathicula cyathoidea (Bull.) Thüm.: Locality 1, on blackberry stem, 23.08.2011, Akata & Yuzun 869.

Hymenoscyphus calyculus (Sowerby) W. Phillips: Locality 18, on beech branch, 11.09.2011, Akata & Yuzun 923.

Family *Helvellaceae*

Helvella atra J. König: Locality 19, near spruce and beech mixed forest, 03.10.2011, Akata & Yuzun 973.

Helvella crispa (Scop.) Fr.: Locality 9, spruce and beech mixed forest, 15.09.2011, Akata & Yuzun 935.

Helvella elastica Bull.: Locality 10, near spruce forest, 25.09.2011, Akata & Yuzun 952.

Helvella lactea Boud.: Locality 25, near spruce and beech mixed forest, 14.10.2011, Akata & Yuzun 1023.

Family *Hyaloscyphaceae*

Neodasyscypha cerina (Pers.) Spooner: Locality 36, on beech branch, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1473.

Family *Hypocreaceae*

Hypocrea leucopus (P. Karst.) H.L. Chamb.: (Akata 2012b).

Incertae sedis

Tapesia fusca (Pers.) Fuckel: Locality 40, on common hazel branch, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1610.

Family *Lachnaceae*

Lachnum virgineum (Batsch) P. Karst.: Locality 4, on herbaceous stem, 06.09.2011, Akata & Yuzun 888.

Family *Leotiaceae*

Leotia lubrica (Scop.) Pers.: Locality 14, spruce and beech mixed forest, 01.10.2011, Akata & Yuzun 960.

Family *Morchellaceae*

Morchella esculenta (L.) Pers.: Locality 33, near spruce forest, 15.05.2012, Akata & Yuzun 1042.

Family *Pezizaceae*

Peziza badia Pers.: Locality 5, spruce and beech mixed forest, 10.09.2011, Akata & Yuzun 903.

Peziza cerea Sowerby: Locality 35, spruce and beech mixed forest, 17.10.2012, Akata & Yuzun 1395.

Peziza saniosa Schrad.: (Akata & Kaya 2012).

Family *Pyronemataceae*

Aleuria aurantia (Pers.) Fuckel: Locality 1, near road, 23.08.2011, Akata & Yuzun 871.

Cheilymenia granulata (Bull.) J. Moravec: Locality 24, pastureland, on cow dung, 13.10.2011, Akata & Yuzun 1014.

Humaria hemisphaerica (F.H. Wigg.) Fuckel: Locality 26, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1147.

Otidea alutacea (Pers.) Masee: Locality 10, spruce and beech mixed forest, 25.09.2011, Akata & Yuzun 948.

Otidea onotica (Pers.) Fuckel: Locality 15, spruce forest 02.11.2011, Akata & Yuzun 969.

Neottiella rutilans (Fr.) Dennis (Akata & Kaya 2013b).

Rhodoscypha ovilla (Peck) Dissing & Sivertsen (Akata & Kaya 2013b).

Scutellinia scutellata (L.) Lambotte: Locality 5, spruce and beech mixed forest, 10.09.2011, Akata & Yuzun 905.

Tarzetta catinus (Holmsk.) Korf & J.K. Rogers: Locality 18, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 918.

Tarzetta cupularis (L.) Svrcek: Locality 30, spruce and beech mixed forest, 19.10.2011, Akata & Yuzun 1031.

Family *Rutstroemiaceae*

Lanzia echinophila (Bull.) Korf: Locality 1, under chestnut, inner surface of chestnut husk, 15.09.2011, Akata & Yuzun 944.

Family *Sarcoscyphaceae*

Sarcoscypha coccinea (Jacq.) Sacc.: Locality 26, on beech branch, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1121.

Family *Sarcosomataceae*

Plectania rhytidia (Berk.) Nannf. & Korf: Locality 40, on common hazel branch, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1534.

Family *Xylariaceae*

Daldinia concentrica (Bolton) Ces. & De Not.: Locality 3, on beech branch, 23.08.2011, Akata & Yuzun 875.

Hypoxylon fragiforme (Pers.: Fr.) J. Kickx f.: Locality 38, on beech branch, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1467.

Hypoxylon multifforme (Fr.) Fr.: Locality 4, on alder branch, 06.09.2011, Akata & Yuzun 897.

Kretzschmaria deusta (Hoffm.) P.M.D. Martin: Locality 31, on beech stump, 20.10.2011, Akata & Yuzun 1037.

Xylaria carpophila (Pers.) Fr.: Locality 8, on beech husk, 11.09.2011, Akata & Yuzun 931.

Xylaria hypoxylon (L.) Grev.: Locality 36, on beech branch, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1501.

Xylaria longipes Nitschke: Locality 18, on beech stump, 11.09.2011, Akata & Yuzun 919.

Xylaria polymorpha (Pers.) Grev.: Locality 25, on beech stump, 14.10.2011, Akata & Yuzun 1021.

Phylum BASIDIOMYCOTA

Family *Agaricaceae*

Agaricus augustus Fr.: Locality 13, spruce forest, 01.10.2011, Akata & Yuzun 952.

Agaricus luteomaculatus (F.H. Møller) F.H. Møller: Locality 37, spruce forest, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1470.

Agaricus xanthodermus Genev.: Locality 8, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 928.

Bovista nigrescens Pers.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1524.

Bovista plumbea Pers.: Locality 5, 06.09.2011, spruce and beech mixed forest, on path, Akata & Yuzun 900.

Chlorophyllum rhacodes (Vittad.) Vellinga: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 14.10.2011, Akata & Yuzun 1027.

Coprinus comatus (O.F. Müll.) Pers.: Locality 2, pastureland, 23.08.2011, Akata & Yuzun 874.

Crucibulum laeve (Huds.) Kambly: Locality 27, on beech branch, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1134.

Cyathus olla (Batsch) Pers.: Locality 39, 27.10.2012, on beech branch, Akata & Yuzun 1509.

Cyathus striatus (Huds.) Willd.: Locality 29, on beech branch, 19.09.2012, Akata & Yuzun 1166.

Cystoderma granulosa (Batsch) Harmaja: Locality 36, spruce and beech mixed forest, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1479.

Lepiota clypeolaria (Bull.) P. Kumm.: Locality 18, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 920.

Lepiota cristata (Bolton) P. Kumm.: Locality 21, near road, 10.10.2011, Akata & Yuzun 987.

Lepiota magnispora Murrill: Locality 39, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1512.

Lepiota oreadiformis Velen.: Locality 19, near road, 03.10.2011, Akata & Yuzun 972.

Leucoagaricus barssii (Zeller) Vellinga: Locality 34, near road, 17.10.2012, Akata & Yuzun 1434.

Lycoperdon echinatum Pers.: Locality 31, spruce and beech mixed forest, 20.10.2011, Akata & Yuzun 1033.

Lycoperdon excipuliforme (Scop.) Pers.: Locality 20, near spruce forest, 03.10.2011, Akata & Yuzun 980.

Lycoperdon lividum Pers.: Locality 32, near road, 20.10.2011, Akata & Yuzun 1036.

Lycoperdon molle Pers.: Locality 14, spruce and beech mixed forest, 01.10.2011, Akata & Yuzun 955.

Lycoperdon perlatum Pers.: Locality 12, spruce forest, 25.09.2011, Akata & Yuzun 950.

Lycoperdon pratense Pers.: Locality 21, near road, 10.10.2011, Akata & Yuzun 991.

Lycoperdon pyriforme Schaeff.: Locality 11, on spruce stump, 25.09.2011, Akata & Yuzun 945.

Lycoperdon utriforme Bull.: Locality 6, pastureland, 10.09.2011, Akata & Yuzun 908.

Macrolepiota konradii (Huijsman ex P.D. Orton) M.M. Moser: Locality 37, near spruce forest, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1469.

Macrolepiota procera (Scop.) Singer: Locality 8, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 922.

Family *Amanitaceae*

Amanita caesarea (Scop.) Pers.: Locality 26, spruce and beech mixed forest, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1113.

Amanita citrina (Pers.) Pers.: Locality 3, spruce and beech mixed forest, 29.08.2011, Akata & Yuzun 878.

Amanita gemmata (Fr.) Bertill.: Locality 29, spruce and beech mixed forest, 19.10.2011, Akata & Yuzun 1029.

Amanita muscaria (L.) Lam.: Locality 32, near spruce and beech mixed forest, 20.10.2011, Akata & Yuzun 1040.

Amanita pantherina (DC.) Krombh.: Locality 9, spruce and beech mixed forest, 15.09.2011, Akata & Yuzun 939.

Amanita phalloides (Vaill. ex Fr.) Link: Locality 26, spruce and beech mixed forest, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1120.

Amanita rubescens Pers.: Locality 16, spruce and beech mixed forest, 02.10.2011, Akata & Yuzun 966.

Amanita vaginata (Bull.) Lam.: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 14.10.2011, Akata & Yuzun 1025.

Family Auriculariaceae

Auricularia mesenterica (Dicks.) Pers.: Locality 25, on alder stump, 14.10.2011, Akata & Yuzun 1022.

Exidia nigricans (With.) P. Roberts: Locality 35, on beech branch, 17.10.2012, Akata & Yuzun 1460.

Pseudohydnum gelatinosum (Scop.: Fr.) Karst.: Locality 22, on spruce stump, 12.10.2011, Akata & Yuzun 994.

Family Auriscalpiaceae

Lentinellus cochleatus (Pers.) P. Karst: Locality 23, on spruce stump, 12.10.2011, Akata & Yuzun 1005.

Family Bankeraceae

Hydnellum auratile (Britzelm.) Maas Geest.: Locality 10, spruce forest, 25.09.2011, Akata & Yuzun 946.

Hydnellum spongiosipes (Peck) Pouzar: Locality 36, spruce and beech mixed forest, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1461.

Sarcodon imbricatus (L.) P. Karst.: Locality 15, spruce forest, 02.10.2011, Akata & Yuzun 965.

Family Bolbitiaceae

Conocybe arrhenii (Fr.) Kits van Wav.: Locality 21, near road, 10.10.2011, Akata & Yuzun 986.

Conocybe tenera (Schaeff.) Fayod: Locality 6, pastureland, 10.09.2011, Akata & Yuzun 904.

Family Boletaceae

Boletus chrysenteron Bull.: Locality 28, spruce and beech mixed forest, 19.09.2012, Akata & Yuzun 1160.

Boletus edulis Bull.: Locality 23, spruce forest, 12.10.2011, Akata & Yuzun 1004.

Boletus erythropus Pers.: Locality 17, spruce forest, 06.09.2011, Akata & Yuzun 929.

Family Bondarzewiaceae

Heterobasidion annosum (Fr.) Bref.: Locality 22, on spruce stump, 13.06.2013, Akata & Yuzun, 1685

Family Cantharallaceae

Cantharellus cibarius Fr.: Locality 18, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 926.

Craterellus cornucopioides (L.) Pers.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1541.

Craterellus tubaeformis (Fr.) Quéf.: Locality 9, spruce and beech mixed forest, 15.09.2011, Akata & Yuzun 942.

Family Clavariadelphaceae

Clavariadelphus truncatus (Quéf.) Donk: Locality 18, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 925.

Family Clavulinaceae

Clavulina cinerea (Bull.) J. Schröt.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1549.

Clavulina rugosa (Bull.) J. Schröt.: Locality 14, spruce and beech mixed forest, 01.10.2011, Akata & Yuzun 962.

Family Dacrymycetaceae

Calocera cornea (Batsch) Fr.: Locality 23, on spruce stump, 12.10.2011, Akata & Yuzun 993.

Calocera viscosa (Pers.) Fr.: Locality 15, on spruce stump, 02.10.2011, Akata & Yuzun 967.

Dacrymyces stillatus Nees: Locality 40, on beech stump, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1527.

Family Diplocystidiaceae

Astraeus hygrometricus (Pers.) Morgan: Locality 19, near road, 03.10.2011, Akata & Yuzun 983.

Family Entolomataceae

Entoloma asprellum (Fr.) Fayod: (Kaya et al., 2013).

Entoloma rhodopolium (Fr.) P. Kumm.: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1254.

Family Fistulinaceae

Fistulina hepatica (Schaeff.) With.: Locality 40, on common hazel stump, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1530.

Family Fomitopsidaceae

Daedalea quercina (L.) Pers.: Locality 1, on chesnut stump, 23.08.2011, Akata & Yuzun 872.

Fomitopsis pinicola (Sw.) P. Karst.: Locality 32, on spruce stump, 20.10.2011, Akata & Yuzun 1038.

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill: Locality 2, on poplar, 23.08.2011, Akata & Yuzun 868.

Family Ganodermataceae

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst.: Locality 18, on beech root, 11.09.2011, Akata & Yuzun 930.

Family Geastraceae

Geastrum fimbriatum Fr.: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 19.10.2011, Akata & Yuzun 1032.

Geastrum quadrifidum DC. ex Pers.: Locality 37, spruce forest, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1480.

Geastrum rufescens Pers.: Locality 9, spruce and beech mixed forest, 15.09.2011, Akata & Yuzun 940.

Geastrum triplex Jungh: Locality 27, spruce and beech mixed forest, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1154.

Family Gomphaceae

Gomphus clavatus (Pers.) Gray: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1603.

Phaeoclavulina flaccida (Fr.) Giachini: Locality 31, spruce and beech mixed forest, 04.10.2012, Akata & Yuzun, 1294

Ramaria flavescens (Schaeff.) R.H. Petersen: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1533.

Family Hydnaceae

Hydnum repandum L.: Locality 4, spruce and beech mixed forest, 06.09.2011, Akata & Yuzun 887.

Family Hydnangiaceae

Laccaria laccata (Scop.) Cooke: Locality 26, spruce and beech mixed forest, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1118.

Family Hygrophoraceae

Cuphophyllus virgineus (Wulfen) Kovalenko: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1531.

Gliophorus psittacinus (Schaeff.) Herink: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1298.

Hygrocybe acutoconica (Clem.) Singer: Locality 28, spruce and beech mixed forest, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1326.

Hygrocybe conica (Schaeff.) P. Kumm.: Locality 6, pastureland, 10.09.2011, Akata & Yuzun 915.

Hygrophorus agathosmus (Fr.) Fr.: Locality 30, spruce and beech mixed forest, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1265.

Hygrophorus chrysodon (Batsch) Fr.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1537.

Hygrophorus erubescens (Fr.) Fr.: Locality 31, spruce and beech mixed forest, 29.09.2012, Akata & Yuzun 1229.

Hygrophorus pudorinus (Fr.) Fr.: Locality 18, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 932.

Family Hymenochaetaceae

Hymenochaete rubiginosa (Dicks.) Lév.: Locality 31, on stump, 29.09.2012, Akata & Yuzun 1225.

Phellinus viticola (Schwein.) Donk: Locality 14, on spruce stump, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1372.

Family Hymenogastraceae

Hebeloma sinapizans (Paulet) Gillet: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1525.

Incertae sedis

Panaeolus papilionaceus (Bull.) Quél.: Locality 32, near road, on cow dung, 20.10.2011, Akata & Yuzun 1034.

Family Inocybaceae

Crepidotus casparyi Velen.: Locality 30, on beech branch, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1261.

Crepidotus epibryus (Fr.) Quél.: Locality 25, on beech leaves, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1291.

Inocybe asterospora Quél.: Locality 9, spruce and beech mixed forest, 15.09.2011, Akata & Yuzun 937.

Inocybe cervicolor (Pers.) Quél.: Locality 31, spruce and beech mixed forest, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1376.

Inocybe geophylla (Fr.) P. Kumm.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1555.

Inocybe praetervisa Quél.: Locality 4, spruce and beech mixed forest, 06.09.2011, Akata & Yuzun 890.

Inocybe rimosa (Bull.) P. Kumm.: Locality 22, spruce forest, 12.10.2011, Akata & Yuzun 996.

Family Lyophyllaceae

Asterophora lycoperdoides (Bull.) Ditmar Locality 25, on rotten *Russula* Pers., 04.10.2012, Akata & Yuzun 1287.

Asterophora parasitica (Bull. ex Pers.) Singer: Locality 28, on rotten *Russula*, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1311.

Family Marasmiaceae

Macrocyttidia cucumis (Pers.) Joss.: Locality 31, spruce and beech mixed forest, 29.09.2012, Akata & Yuzun 1240.

Marasmius bulliardii Quél.: Locality 30, on beech leaves, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1272.

Marasmius oreades (Bolton) Fr.: Locality 14, spruce and beech mixed forest, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1373.

Marasmius rotula (Scop.) Fr.: Locality 25, on beech branch, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1259.

Family Mycenaceae

Mycena epipterygia (Scop.) Gray: Locality 40, on the remains of spruce wood, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1563.

Mycena galopus (Pers.) P. Kumm.: Locality 31, the remains of beech wood, 29.09.2012, Akata & Yuzun 1236.

Mycena pura (Pers.) P. Kumm.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1539.

Mycena sanguinolenta (Alb. & Schwein.) P. Kumm.: Locality 30, spruce and beech mixed forest, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1256.

Mycena silvae-nigrae Maas Geest. & Schwöbel: Locality 16, on spruce stump, 13.10.2011, Akata & Yuzun 1009.

Mycena stipitata Maas Geest. & Schwöbel: Locality 28, on spruce stump, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1330.

Panellus stipticus (Bull.) P. Karst.: Locality 14, on beech branch, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1348.

Meruliaceae

Bjerkandera adusta (Willd.) P. Karst.: Locality 22, on beech stump, 13.06.2013, Akata & Yuzun 1689.

Family Omphalotaceae

Gymnopus confluens (Pers.) Antonín, Halling & Noordel.: Locality 14, spruce and beech mixed forest, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1362.

Gymnopus dryophilus (Bull.) Murrill: Locality 25, 04.10.2012, spruce and beech mixed forest, Akata & Yuzun 1281.

Gymnopus erythropus (Pers.) Antonín, Halling & Noordel.: Locality 31, on beech stump, 29.09.2012, Akata & Yuzun 1210.

Mycetinis scorodonius (Fr.) A.W. Wilson & Desjardin: Locality 28, spruce and beech mixed forest, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1332.

Rhodocollybia butyracea (Bull.) Lennox: Locality 30, spruce and beech mixed forest, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1299.

Family Paxillaceae

Paxillus involutus (Batsch) Fr.: Locality 16, spruce forest, 13.10.2011, Akata & Yuzun 1008.

Family Phallaceae

Clathrus ruber P. Micheli ex Pers.: Locality 18, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 921.

Mutinus caninus (Huds.) Fr.: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1273.

Phallus impudicus L.: Locality 9, 15.09.2011, spruce and beech mixed forest, Akata & Yuzun 938.

Family Physalacriaceae

Armillaria mellea (Vahl) P. Kumm.: Locality 25, on beech stump, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1277.

Mucidula mucida (Schrad.) Pat.: Locality 40, on beech stump, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1567.

Hymenopellis radicata (Relhan) R.H. Petersen: Locality 30, on beech root, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1290.

Xerula pudens (Pers.) Singer: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1551.

Family Pleurotaceae

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm.: Locality 30, on beech stump, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1276.

Family Pluteaceae

Pluteus atromarginatus (Konrad) Kühner: Locality 9, on spruce stump, 15.09.2011, Akata & Yuzun 941.

Family Polyporaceae

Cerioporus squamosus (Huds.) Quél.: Locality 1, on stump, 23.08.2011, Akata & Yuzun 877.

Lenzites betulina (L.) Fr.: Locality 31, on beech branch, 29.09.2012, Akata & Yuzun 1233.

Panus conchatus (Bull.) Fr. Locality 28, on beech stump, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1312.

Polyporus melanopus (Pers.) Fr.: Locality 30, on beech stump, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1257.

Picipes badius (Pers.) Zmitr. & Kovalenko: Locality 5, on alder stump, 10.09.2011, Akata & Yuzun 900.

Trametes hirsuta (Wulfen) Lloyd: Locality 40, on beech stump, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1526.

Trametes versicolor (L.) Lloyd: Locality 31, on beech stump, 29.09.2012, Akata & Yuzun 1246.

Family Psathyrellaceae

Coprinellus disseminatus (Pers.) J.E. Lange: Locality 40, on beech stump, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1570.

Coprinellus micaceus (Bull.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson: Locality 14, on the remains of beech wood, 01.10.2011, Akata & Yuzun 964.

Coprinellus xanthothrix (Romagn.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson: Locality 40, on the remains of beech wood, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1545.

Coprinopsis atramentaria (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo: Locality 6, pastureland, 10.09.2011, Akata & Yuzun 906.

Family Russulaceae

Lactarius aurantiacus (Pers.) Gray: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 14.10.2011, Akata & Yuzun 1026.

Lactarius piperatus (L.) Pers.: Locality 29, spruce and beech mixed forest, 13.10.2011, Akata & Yuzun 1006.

Lactarius scrobiculatus (Scop.) Fr.: Locality 14, spruce and beech mixed forest, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1343.

Lactarius vellereus (Fr.) Fr.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1561.

Lactarius volemus (Fr.) Fr.: Locality 29, spruce and beech mixed forest, 13.10.2011, Akata & Yuzun 1002.

Russula chloroides (Krombh.) Bres.: Locality 31, spruce and beech mixed forest, 29.09.2012, Akata & Yuzun 1217.

Russula cyanoxantha (Schaeff.) Fr.: Locality 9, spruce and beech mixed forest, 15.09.2011, Akata & Yuzun 941.

Russula emetica (Schaeff.) Pers.: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 04.10.2012, Akata & Yuzun 1266.

Family Schizophyllaceae

Schizophyllum commune Fr.: Locality 2, on fallen branch, 23.08.2011, Akata & Yuzun 873.

Family Sclerodermataceae

Scleroderma bovista Fr.: Locality 32, near road, 20.10.2011, Akata & Yuzun 1039.

Scleroderma polyrhizum (J.F. Gmel.) Pers.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1522.

Family Stereaceae

Stereum hirsutum (Willd.) Pers.: Locality 22, on beech stump, 13.06.2013, Akata & Yuzun 1687.

Stereum rameale (Schwein.) Burt: Locality 36, on beech stump, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1486.

Family Strophariaceae

Hypholoma fasciculare (Huds.) P. Kumm.: Locality 40, on common hazel stump, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1521.

Pholiota lucifera (Lasch) Quél.: Locality 25, on alder stump, 14.10.2011, Akata & Yuzun 1028.

Stropharia aeruginosa (Curtis) Quél.: Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1553.

Stropharia rugosoannulata Farl. ex Murrill: Locality 39, near spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1509.

Family Suillaceae

Suillus collinitus (Fr.) Kuntze: Locality 1, under pine, 13.10.2011, Akata & Yuzun 1016.

Suillus granulatus (L.) Roussel: Locality 38, spruce and beech mixed forest, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1486.

Family Tapinellaceae

Tapinella atrotomentosa (Batsch) Šutara: Locality 13, on spruce stump, 01.10.2011, Akata & Yuzun 957.

Family Tricholomataceae

Clitocybe foetens Melot: Locality 5, spruce and beech mixed forest, 06.09.2011, Akata & Yuzun 893.

Clitocybe gibba (Pers.) P. Kumm.: Locality 31, spruce and beech mixed forest, 11.10.2012, Akata & Yuzun 1368.

Clitocybe nebularis (Batsch) P. Kumm. Locality 40, spruce and beech mixed forest, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1556.

Clitocybe odora (Bull.) P. Kumm.: Locality 27, spruce and beech mixed forest, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1151.

Delicatula integrilla (Pers.) Fayod: Locality 40, on common hazel stump, 27.10.2012, Akata & Yuzun 1550.

Lepista nuda (Bull.) Cooke: Locality 8, spruce and beech mixed forest, 11.09.2011, Akata & Yuzun 917.

Myxomphalia maura (Fr.: Fr.) Hora: Locality 37, spruce forest, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1468.

Paralepista flaccida (Sowerby) Vizzini: Locality 25, spruce and beech mixed forest, 14.10.2011, Akata & Yuzun 1024.

Tricholoma terreum (Schaeff.) P. Kumm.: Locality 16, spruce forest, 02.10.2011, Akata & Yuzun 970.

Tricholoma vaccinum (Schaeff.) P. Kumm.: Locality 22, spruce forest, 12.10.2011, Akata & Yuzun 995.

Tricholomopsis rutilans (Schaeff.) Singer: Locality 17, on spruce stump, 06.09.2011, Akata & Yuzun 892.

Family Tremellaceae

Tremella encephala Pers.: Locality 38, on spruce stump, 26.10.2012, Akata & Yuzun 1497.

Tremella foliacea Pers.: Locality 14, on beech stump, 01.10.2011, Akata & Yuzun 954.

Tremella mesenterica Retz.: Locality 27, on beech stump, 08.09.2012, Akata & Yuzun 1186.

Discussion

Uzungöl Nature Park was a region where data on its macrofungal diversity was lacking until the present study. Previous studies in the region revealed presence of only 7 macrofungi species (Akata 2012a,b, Akata & Kaya 2013a,b, Kaya *et al.* 2013). Our present detailed sampling in the region added 205 species to the macromycota of the region, indicating a relatively rich biodiversity for a relatively small area. We, therefore included all recorded species in our present list with which we listed 212 species belonging to 129 genera and 64 families inside the boundaries of Uzungöl Nature Park. The list included 46 members in *Ascomycota* (*Caloscyphaceae*, *Chlorociboriaceae*, *Diatrypaceae*, *Geoglossaceae*, *Hyaloscyphaceae*, *Hypocreaceae*, *Lachnaceae*, *Leotiaceae*, *Morchellaceae*, *Rutstroemiaceae*, *Sarcoscyphaceae* and *Sarcosomataceae* and Incertae sedis, 1; *Cudoniaceae* and *Pezizaceae* 3; *Helvellaceae* 4; *Helotiaceae* 5; *Xylariaceae* 8 and *Pyronemataceae* 10) and 166 members in *Basidiomycota* (*Auriscalpiaceae*, *Bondarzewiaceae*, *Clavariadelphaceae*, *Diplocystidiaceae*,

Fistulinaceae, *Ganodermataceae*, *Hydnaceae*, *Hydnangiaceae*, *Hymenogastraceae*, *Meruliaceae*, *Paxillaceae*, *Pleurotaceae*, *Pluteaceae*, *Schizophyllaceae* and *Tapinellaceae* and Incertae sedis 1; *Bolbitiaceae*, *Clavulinaceae*, *Entolomataceae*, *Hymenochaetaceae*, *Lyophyllaceae*, *Sclerodermataceae*, *Stereaceae* and *Suillaceae* 2; *Auriculariaceae*, *Bankeraceae*, *Boletaceae*, *Cantharallaceae*, *Dacrymycetaceae*, *Fomitopsidaceae*, *Gomphaceae*, *Phallaceae* and *Tremellaceae* 3; *Geastraceae*, *Marasmiaceae*, *Physalacriaceae*, *Strophariaceae* and *Psathyrellaceae* 4; *Omphalotaceae* 5; *Inocybaceae*, *Mycenaceae* and *Polyporaceae* 7; *Amanitaceae*, *Hygrophoraceae* and *Russulaceae* 8; *Tricholomataceae* 11 and *Agaricaceae* 26).

The most widespread macrofungi species in the nature park were; *Armillaria mellea*, *Boletus chrysenteron*, *Cantharellus cibarius*, *Cyathus striatus*, *Coprinellus disseminatus*, *Fomitopsis pinicola*, *Hydnum repandum*, *Hymenopellis radicata*, *Hypholoma fasciculare*, *Inocybe geophylla*, *Laccaria laccata*, *Lactarius volemus*, *Lycoperdon lividum*, *L. perlatum*, *Macrolepiota procera*,

Mycena pura, *Sarcodon imbricatus*, *Schizophyllum commune*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor*, *Tremella mesenterica* and *Xylaria hypoxylon*.

Although 50 of 212 species determined in the study area are known to be suitable for human consumption only 5 species (*Cantharellus cibarius*, *Hydnum repandum*, *Macrolepiota procera*, *Lactarius volemus* and *Sarcodon imbricatus*) are commonly eaten by local people. There are also 17 poisonous species (*Agaricus xanthodermus*, *Amanita gemmata*, *A. muscaria*, *A. pantherina*, *A. phalloides*, *Boletus erythropus*, *Coprinopsis atramentaria*, *Entoloma rhodopolium*, *Hypholoma fasciculare*, *Inocybe geophylla*, *I. rimosa*, *Lactarius piperatus*, *Lepiota clypeolaria*, *L. cristata*, *Paxillus involutus*, *Russula emetica* and *Tapinella atrotomentosa*) determined in the study area among which *A. phalloides* is the most dangerous one that is responsible for 95% of deadly mushroom poisonings in Turkey (Akata *et al.* 2015). Due to collection and consumption of only well known edible mushrooms generally by local people, no poisoning case in the nature park has been reported so far.

References

- Akata, I. 2012a. A New Ascomycete Genus Record for Turkey. *Ot Sistematiik Botanik Dergisi*, 19 (1): 113-116.
- Akata, I. 2012b. A new Ascomycete family record for Turkish Macromycota. *Biological Diversity and Conservation*, 5(3): 37-39.
- Akata, I. & Doğan, H.H. 2015. *Orbiliaceae* for Turkish Ascomycota: Three new records. *Bangladesh Journal of Botany*, 44(1): 91-95.
- Akata, I. & Kaya, A. 2012. Two New Additions to Turkish Ascomycota. *International Journal of Botany*, 8(2): 79-81.
- Akata, I. & Kaya, A. 2013a. Two earth-tongue genera new for Turkey. *Mycotaxon*, 125: 87-90.
- Akata, I. & Kaya, A. 2013b. Three pyronemataceous macrofungi genera new to Turkish Mycota. *Turkish Journal of Botany*, 37(5): 977-980.
- Akata, I., Kaya, A. & Uzun, Y. 2011. New additions to Turkish Pyronemataceae. *Biological Diversity and Conservation*, 4(1): 182-185.
- Akata, I., Kaya, A. & Uzun, Y. 2012. New Ascomycete records for Turkish macromycota. *Turkish Journal of Botany*, 36(4): 420-424.
- Akata, I., Kaya, A. & Uzun, Y. 2014. Macromycetes determined in Yomra (Trabzon) district. *Turkish Journal of Botany*, 38(5): 999-1012.
- Akata, I., Kaya, A. & Uzun, Y. 2016a. Macrofungi diversity of Zigana Mountain (Gümüşhane/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 9(2): 57-69.
- Akata, I., Kaya, A. & Uzun, Y. 2016b. Two New Genus Records for Turkish Helotiales. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 16(1): 131-134.
- Akata, I., Kaya, E., Yılmaz, İ., Bakırcı, S. & Bayram, R. 2015. Türkiye'de Yetişen Alfa Amanitin İçeren Mantarlar. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(1): 39-44.
- Allı, H., Şen, İ. & Altuntaş, D. 2016. Macrofungi of İznik Province. Communications. *Faculty of Science University of Ankara, Series C: Biology*, 25(1-2): 7-24.
- Arıkan, H., Tosunoğlu, M., Atatür, M.K. & Göçmen, B. 2007. Some Comments on the Breeding Biology of *Pelodytes caucasicus* Boulenger, 1896 (Anura: Pelodytidae) from Uzungöl, Northeast Anatolia. *Turkish Journal of Zoology*, 31(1): 53-64.
- Atasoy, M. 2010. Monitoring land use changes in tourism centers with GIS: Uzungöl case study. *Scientific Research and Essays*, 5(8): 790-798.
- Bas, C., Kuyper, T.W., Noordeloos, M.E. & Vellinga, E.C. 1988. *Flora Agaricina Neerlandica-Critical monographs on the families of agarics and boleti occurring in the Netherlands. Volume 1. Entolomataceae*. A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, 182 pp.
- Bas, C., Kuyper, T.W., Noordeloos, M.E. & Vellinga, E.C. 1990. *Flora Agaricina Neerlandica-Critical monographs on the families of agarics and boleti occurring in the Netherlands. Volume 2. Pluteaceae, Tricholomataceae*. A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, 137 pp.
- Bas, C., Kuyper, T.W., Noordeloos, M.E. & Vellinga, E.C. 1995. *Flora Agaricina Neerlandica-Critical monographs on the families of agarics and boleti occurring in the Netherlands. Volume 3. Tricholomataceae*. A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, 183 pp.
- Baydar, S. & Sesli, E. 1994. The macromycetes determined in Akçaabat District of Trabzon Province. *Turkish Journal of Botany*, 18: 99-101.
- Boertmann, D. 1996. *The Genus Hygrocybe (Fungi of Northern Europe, Vol. 1)*. Danish Mycological Society, Copenhagen, Denmark, 184 pp.
- Breitenbach, J. & Kränzlin, F. 1984. *Fungi of Switzerland, Vol: 1, Ascomycetes*. Verlag Mykologia CH-6000 Luzern 9, Switzerland, 310 pp.

22. Breitenbach, J. & Kränzlin, F. 1986. *Fungi of Switzerland. Vol: 2, Nongilled Fungi*. Verlag Mykologia CH-6000 Luzern 9, Switzerland, 412 pp.
23. Breitenbach, J. & Kränzlin, F. 1991. *Fungi of Switzerland. Vol: 3, Boletes and Agarics 1. Part*. Verlag Mykologia CH-6000 Luzern 9, Switzerland, 361 pp.
24. Breitenbach, J. & Kränzlin, F. 1995. *Fungi of Switzerland. Vol: 4, Agarics 2. Part*. Verlag Mykologia CH-6000 Luzern 9, Switzerland, 368 pp.
25. Breitenbach, J. & Kränzlin, F. 2000. *Fungi of Switzerland. Vol: 5, Agarics 3. Part*. Verlag Mykologia CH-6000 Luzern 9, Switzerland, 338 pp.
26. Cannon, P.F. & Kirk, P.M. 2007. *Fungal families of the world*. CAB International, Wallingford, 456 pp.
27. Demirel, K., Acar, İ. & Ömeroğlu Boztepe, G. 2016. Lice (Diyarbakır) Yöresi Makrofungusları. *Mantar Dergisi*, 7(1): 29-39.
28. Doğan, H.H. & Öztürk, Ö. 2015. Six new *Russula* records from Turkey. *Mycotaxon*, 130(4): 1117-1124.
29. Doğan, H.H. & Kurt, F. 2016. New macrofungi records from Turkey and macrofungal diversity of Pozanti-Adana. *Turkish Journal of Botany*, 40(2): 209-217.
30. Dülger, B. & Akata, I. 2016. *Lasiosphaeria ovina*, A first record for family *Lasiosphaeriaceae* in Turkey. *Mantar Dergisi*, 7(1): 88-91.
31. Fan, L., Liu, B. & Liu, H.Y. 1994. *The Gasteromycetes of China*. Gebrüder Borntraeger, Stuttgart, 72 pp.
32. Hansen, L. & Knudsen, H. 1992. *Nordic Macromycetes. Volume 2. Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales*. Nordsvamp, Copenhagen, Denmark, 474 pp.
33. Hansen, L. & Knudsen, H. 1997. *Nordic Macromycetes. Volume 3. Heterobasidoid, Aphyllophoroid, and Gastromycetoid Basidiomycetes*. Nordsvamp, Copenhagen, Denmark, 444 pp.
34. Hansen, L. & Knudsen, H. 2000. *Nordic Macromycetes. Volume 1. Ascomycetes*. Nordsvamp, Copenhagen, Denmark, 209 pp.
35. Kaya, A., Akata, I. & Uzun, Y. 2013. Two new records for Turkish *Agaricales*. *Biological Diversity and Conservation*, 6(3): 150-152.
36. Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the fungi, 10th ed.* CAB International. Wallingford, UK, 771 pp.
37. Kränzlin, F. 2005. *Fungi of Switzerland. Volume 6. Russulaceae 2*. Verlag Mykologia, Switzerland, 319 pp.
38. Kuyper, T.W. 1986. *A Revision of the Genus Inocybe in Europe*. Rijksherbarium, Leiden, 247 pp.
39. Medardi, G. 2006. *Atlante fotografico degli Ascomiceti d'Italia*. A.M.B. Fondazione, Centro Studi Micologici, Italia, 454 pp.
40. Pegler, D.N., Roberts, P.J. & Spooner, B.M. 1997. *British Chanterelles and Tooth Fungi*. Royal Botanic Gardens, Kew, 114 pp.
41. Ryvarden, L. & Gilbertson, R.L. 1993. *European Polypores Vol: 1-2, Synopsis Fungorum 6*. Fungiflora, Oslo, Norway, 745 pp.
42. Sesli, E. 1993. Trabzon ili Maçka yöresi makrofungusları. *Turkish Journal of Botany*, 17: 179-182.
43. Sesli, E. & Denchev, C.M. 2008. Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. *Mycotaxon*, 106: 65-67.
44. Sesli, E., Türkekul, İ., Akata, I. & Niskanen, T. 2016. New records of Basidiomycota from Trabzon, Tokat, and İstanbul provinces in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 40(5): 531-545.
45. Sunhede, S. 1989. *Geastraceae (Basidiomycotina), Synopsis Fungorum 1*. Fungiflora, Oslo, Norway, 533 pp.
46. Uzun, Y., Acar, İ, Akçay, M.E. & Akata, I. 2014. Additions to the Turkish *Discomycetes*. *Turkish Journal of Botany*, 38(3): 617-622.
47. Uzun, Y., Kaya, A., Akata, I, Keleş, A. & Yakar, S. 2015. Notes on Turkish *Hypocrea*. *Biological Diversity and Conservation*, 8(2): 117-121.
48. Verep, B., Şahin, C., Çiloğlu, E. & İmamoğlu, H.O. 2002. Uzungöl'ün İklimi ve Çevresel Sorunları Üzerine Bir Çalışma. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(4): 353-358.

YABANI *Vicia aintabensis* BOISS. & HAUSSKN. EX BOISS KÖK NODÜLLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Rhizobium* FRANK İZOLATLARININ TUZ TOLERANSI VE PHB ÜRETİMİ

Çiğdem KÜÇÜK

Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa
Corresponding author: e-mail: ckucuk@harran.edu.tr

Alınış (Received): 18 Kasım 2016, Kabul (Accepted): 2 Aralık 2016, Erken Görünüm (Online First): 6 Nisan 2017, Basım (Published): 15 Haziran 2017

Özet: Bu çalışmada, yabancı *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* Frank izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarına (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ve 450mM) toleranslarının ve bu tuz konsantrasyonlarının izolatların poli-β-hidroksibütirik asit (PHB) üretimlerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, izolatların farklı tuz toleransına sahip olduklarını ortaya koymuştur. Tuz konsantrasyonlarından en fazla etkilenen V4.6 izolatı olmuştur. İzolatların PHB verimi (kuru hücre ağırlığına göre) %0,62-27 arasındadır. Artan tuz konsantrasyonları izolat gelişimini inhibe ederken, PHB depolanmasını teşvik etmiştir. Kök nodül izolatları tarafından tuz stres koşullarında PHB üretimi tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Poli-β-hidroksibütirik asit, yabancı *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss, izolat, tuz konsantrasyonu.

Salt tolerance and PHB production of *Rhizobium* Frank isolates of root nodules of wild *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss

Abstract: This study was performed in order to determine the tolerance of *Rhizobium* Frank isolates obtained from root nodules of wild *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss to different NaCl concentrations (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 and 450mM) and to determine the effects of these different salt concentrations on poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) production of the isolates. The results showed that the isolates showed different salt tolerance responses. V4.6 isolate was found to be the most affected isolate by salt concentrations. The PHB yield of the isolates (in terms of cell dry weight) was between 0.62-27%. Increasing salt concentrations inhibited isolate growths but stimulated PHB accumulation. PHB production by root nodule isolates under salt-stress conditions was discussed.

Key words: Poly-β-hydroxybutyric acid, wild *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss, isolate, salt concentration.

Giriş

Dünyada karasal alanların yaklaşık %40 kadarının tuzluluk problemi gösterdiği açıklanmıştır (Gorji ve ark. 2015). Özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde, üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden biri olan tuzluluk ile ülkemizde de, yaklaşık 1,5 milyon hektar alanda savaşılmaktadır (Çullu 2011). Sulama için kullanılan su kaynakları veya topraklarda tuzluluğun artması, birçok tarımsal ürünün verimini azaltmakta, bitkilerin gelişimlerinde değişikliklere yol açmaktadır (Cordovilla ve ark. 1994). Osmotik stres gibi direk toksik etkiye sahip, artan tuz konsantrasyonları toprak mikrobiyal popülasyonunu olumsuz etkilemekle birlikte (Tate 1995), baklagil bitkileri gelişme dönemlerinde tuzdan etkilenmektedirler (Cordovilla ve ark. 1994, Zahran 1991). Baklagil bitkileri arasında da tuza toleranslılık bakımından farklılıklar incelenmiştir (Zahran 1991). *Vicia faba* Moench, *Phaseolus vulgaris* Alef, bazı *Vicia* sp. türleri (Zahran ve Sprent 1986), *Glycine max*

Merrill gibi bazı baklagillerin diğer baklagil türlerine göre tuza daha toleranslı oldukları, *V. faba* Moench'in toleranlı hatlarının tuzlu koşullarda da azot fiksasyonunu gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Zahran ve Sprent 1986).

Buna karşın, *Rhizobium* Frank ve *Bradyrhizobium* Jordan cinsi kök nodül bakterileri konukçuları olan baklagillere göre tuza karşı daha toleranslı olmalarına rağmen, bu bakteri izolatlarının tuza karşı dirençlilikleri farklılık göstermektedir (Abdel-Wahab ve Zahran 1979).

Rhizobium leguminosarum Frank izolatlarının sıvı kültürde 350mM NaCl konsantrasyonuna toleranslı olduğu bildirilmiştir (Abdel-Wahab ve Zahran 1979). Soya fasulyesi ve nohutta kök nodülleri oluşturan *Rhizobium* izolatlarının 340mM NaCl'e toleranslı oldukları ayrıca hızlı gelişen izolatların yavaş gelişenlere göre tuza daha dirençli olduğu yapılan bir çalışmada açıklanmıştır (El-Sheikh ve Wood 1990). Özellikle yabancı baklagillerden izole edilen *Rhizobium* Frank

izolatlarının tuz toleransının yüksek olduğu, 1,8M NaCl üzerindeki yüksek tuz konsantrasyonlarında bile gelişme gösterdikleri bildirilmiştir (Tate 1995). Baklagil yem bitkilerinden izole edilen *R. meliloti* Dangeard, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Frank (El-Mokadem ve ark. 1991) ile soya fasulyesi (El-Sheikh ve Wood 1995) ve yoncadan izole edilen *Rhizobium* Frank izolatlarının (Mashhady ve ark. 1998) tuzlu koşullarda gelişme gösterdikleri saptanmıştır. Mikroorganizmalar; ozmotik basıncı dengeleyebilmek için karbonhidratları, betainleri, aminoasitleri ve potasyum gibi inorganik iyonları depolayabilmektedirler (Hua ve ark. 1982).

Poli-β-hidroksibütiratın (PHB), bakteri hücrelerinde en çok bulunan mikrobiyal poliestерlerden olduğu Anderson ve Dawes (1990), Junior ve ark. (2011) tarafından açıklanmıştır. *Rhizobium* Frank bakterilerinin hücre kuru ağırlıklarının %55'inden daha fazla PHB ürettiği rapor edilmiştir (Lakshmi ve ark. 2012, Tombolini ve Nuti 1989). Bu mikrobiyal poliestерler, uygun olmayan koşullarda gelişme sırasında intrasellüler inklüzyonlar olarak oluşmaktadır (Anderson ve Dawes 1990).

Stres koşullarında *Rhizobium* Frank bakterilerinde depolanan PHB'nin kök enfeksiyonu sırasında önemli karbon ve enerji kaynağı olduğu açıklanmıştır (Charles ve ark. 1997). Stam ve ark. (1986) PHB'nin nodüllerde oksijen konsantrasyonunun artması ile nitrojenazı koruduğu, nodül dışında besin yetersizliğinde ise karbon ve enerji kaynağı olarak bakteri gelişimine hizmet ettiğini bildirmişlerdir. Çalışmada tarımsal açıdan önemli olan *Rhizobium* Frank bakterilerinin tuz stresine karşı PHB'nin olası rolünü belirlemek için, daha önce yabancı *Vicia aintabensis* kök nodüllerinden izole edilen 10 *Rhizobium* sp. Frank izolatının farklı NaCl konsantrasyonlardaki gelişimleri ve PHB üretimleri üzerine farklı NaCl konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada Şanlıurfa ve çevresinde doğal olarak yetişen yabancı *Vicia aintabensis* (antep fiği) kök nodüllerinden daha önce izole edilmiş ve tanımlamaları yapılmış olan *Rhizobium* sp. Frank izolatları kullanılmıştır (Küçük ve ark. 2011). İzolatlar Harran Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarından sağlanmıştır. İzolatların bazı morfolojik ve fizyolojik özellikleri Jordan (1984)'a göre yapılmış ve Tablo 1'de verilmiştir.

İzolatların farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişmeleri

Yeast ekstrakt mannitol broth (YEM) besiyerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450mM) NaCl eklenerek hazırlanan besiyeri ortamları 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Sterilizasyon sonrası, 10ml besiyeri içeren tüplere 10⁹kob/ml içeren bakteri kültüründen 0,5ml ayrı ayrı inokule edilmiştir. Bakteriyal izolatlar 27±2°C'de 48saat süre ile geliştirilmiştir. İzolatların gelişimleri 620nm

dalgı boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür (Abdelmoumen ve ark. 1999, Fauturi ve ark. 2001).

İzolatların Poli-β-hidroksibütirik asit üretimlerinin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren yeast ekstrakt mannitol sıvı besiyerinde 150rpm, 27±2°C'de 48saat geliştirilen izolatlar, 40000xg'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve 50°C'de kurutulup tartımı yapılan pelletlerin üzerine, 5'er ml steril distile su eklenerek 3dakika sonikasyona bırakılmıştır. Hücre süspansiyonuna 2ml HCl (2N) eklenerek, 2saat boyunca 100°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. 6000xg'de 20dk santrifüj sonrası elde edilen pelletlere; 5ml kloroform eklenmiş ve vorteklenmiştir. Daha sonra içerikler, 30°C'de 150rpm'de 24saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ise içerik, 6000xg'de 30dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası içerikten 0,1ml alınıp temiz tüpe aktarılmış ve 100°C'de kloroformun uçurulması sağlanmıştır. 5ml sülfirik asit eklenerek 100°C'de 10-20dk bekletilmiş, 235nm dalgı boyunda spektrofotometrede okuma yapılmıştır (Bonartseva ve Myshkina 1985). İzolatların kuru hücre ağırlıklarında depolanan PHB miktarı, PHB standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Bonartseva ve Myshina 1985).

İstatistiki analiz; MS Excel'de varyans analizine göre izolatlar arası, uygulamalar ve kendi aralarında karşılaştırılarak yapılmıştır (Yurtsever 1984).

Sonuçlar ve Tartışma

Yabancı *Vicia aintabensis* kök nodül izolatları bazı morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre incelenmiş ve izolatların koloni büyüklüklerinin agar ortamında 0,8-2,4mm arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatların tümü çubuk şekilli ve hareketli olup, Gram negatiftir (Tablo 1). İzolatların koloni vizkoziteleri değişiklik göstermekle birlikte; V4.2 ve V4.5 nolu izolatlar oldukça yüksek mukoid koloni oluşturmuşlardır. Sıcaklığa toleranslılıklarında ise, değişiklik göstermişlerdir. Sekiz izolat 42°C'de, iki izolat 38°C'de gelişmiştir. Oksidaz reaksiyonu pozitifdir ve izolatlar test edilen karbon kaynaklarını (glukoz, mannitol, maltoz, ksiloz, mannan, sukroz, sakkaroz, galaktoz) asimile etmişlerdir. İzolatların gösterdikleri bu reaksiyonlar Bergeys'e göre *Rhizobium* bakterileri grubuna girmekle birlikte tür tanısında kesin veriler vermemektedir (Jordan 1984). Çalışmada amaç kök nodül izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişmelerinin incelenmesi ve PHB üretimlerinin belirlenmesi olduğundan tür düzeyindeki tanımlamaları bu çalışmada yapılmamıştır.

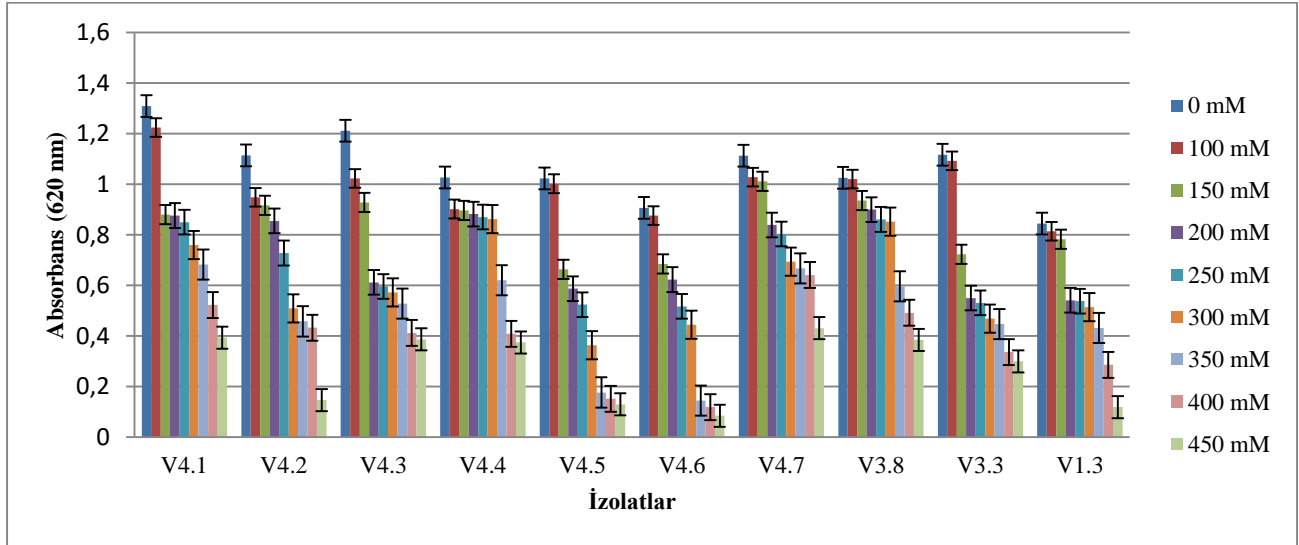
Çalışmada test edilen ve yabancı *Vicia aintabensis* kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* Frank izolatlarının farklı tuz konsantrasyonları içeren ortamlarda farklı gelişme sergiledikleri tespit edilmiştir (Şekil 1).

Yapılan benzer bir çalışmada da, 300mM'den fazla tuz konsantrasyonlarında *Sinorhizobium meliloti* Dangeard'ın gelişme gösterdiği rapor edilmiştir (Sauvage ve ark. 1983). Kassem ve ark. (1985) ise 750mM NaCl'e

Tablo 1. Yabani *Vicia aintabensis* kök nodül izolatlarının bazı morfolojik ve fizyolojik özellikleri.

Özellikler	İzolatlar									
	V4.1	V4.2	V4.3	V4.4	V4.5	V4.6	V4.7	V3.8	V3.3	V1.3
Gram boyama reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YEMA'da Koloni büyüklüğü (mm)	2,1	2,0	1,5	0,8	1,1	2,2	2,4	2,0	2,2	1,6
Hücre şekli	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk
Mukoz oluşumu	yüksek	çok yüksek	orta	düşük	çok yüksek	yüksek	orta	yüksek	düşük	orta
Farklı pH'larda üreme	5,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	5,5-8,5	5,5-8,5	6,5-8,5	5,5-8,5	5,5-8,5	6,5-8,5
Sıcaklık toleransı (°C)	42	42	42	42	42	38	42	38	42	42
Spor oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz reaksiyonu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Litmus milkte alkali reaksiyon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kongo kırmızısı içeren YEMA da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: pozitif, -: negatif

**Şekil 1.** Farklı tuz konsantrasyonlarında *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının gelişimleri ($p < 0.05$).

Rhizobium Frank izolatlarının toleranslı olduğunu, 900mM NaCl içeren ortamda ise izolatların gelişmelerinin inhibe olduğunu saptamışlardır. El-Sheikh ve Wood (1990), nohut kök nodüllerinden izole ettikleri *Rhizobium* Frank izolatlarının Na₂SO₄, NaCl, MgSO₄, K₂SO₄ ve KCl gibi farklı tuzların %1 ve %1,5 düzeylerindeki konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda gelişebildiklerini belirlemişlerdir. İzolatlar arasında gelişimi en fazla inhibe olan V4.6 nolu izolat olarak saptanmıştır. Bunu sırası ile V4.5 ve V4.2 nolu izolatlar izlemiştir (Şekil 1). Farklı tuz

konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda izolatlarımızın tuza karşı toleranslılıklarında belirlenen farklılıklarını, izolatların birbirlerinden farklı olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan benzer çalışmada da, soyafasulyesi ve nohut kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının 340mM NaCl'e, börülce kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının ise 450mM NaCl'e toleranslı oldukları saptanmıştır (Abdal 2016). Saf kültürde ve toprak gibi kompleks ortamda

Tablo 2. Farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen yabancı *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının kuru hücre ağırlıkları ($g\ l^{-1}$), PHB içerikleri ($g\ l^{-1}$) ve varyans analizi.

İzolatlar	Kuru hücre ağırlıkları (KHA) ($g\ l^{-1}$)								
	0mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM	350mM	400mM	450mM
V4.1	0,31	0,29	0,20	0,21	0,20	0,18	0,16	0,17	0,09
V4.2	0,26	0,22	0,21	0,20	0,17	0,12	0,10	0,29	0,03
V4.3	0,29	0,24	0,22	0,14	0,14	0,13	0,12	0,17	0,09
V4.4	0,24	0,22	0,21	0,20	0,20	0,20	0,15	0,09	0,08
V4.5	0,23	0,24	0,15	0,13	0,12	0,08	0,04	0,03	0,03
V4.6	0,22	0,21	0,16	0,14	0,12	0,16	0,03	0,02	0,02
V4.7	0,27	0,24	0,24	0,19	0,19	0,20	0,15	0,15	0,10
V3.8	0,25	0,24	0,22	1,14	0,21	0,21	0,14	0,11	0,09
V3.3	0,27	0,26	0,17	0,13	0,12	0,11	0,10	0,08	0,07
V1.3	0,12	0,19	0,18	0,12	0,12	0,12	0,10	0,06	0,02
Ortalama	0,236	0,235	0,196	0,26	0,159	0,151	0,109	0,117	0,062
İzolatlar	PHB içeriği ($g\ l^{-1}$)								
	0mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM	350mM	400mM	450mM
V4.1	0,021	0,0057	0,0063	0,0067	0,0078	0,0098	0,0086	0,0071	0,0064
V4.2	0,018	0,0025	0,0052	0,0058	0,0062	0,0075	0,0104	0,0121	0,0035
V4.3	0,02	0,0048	0,0071	0,0076	0,008	0,0087	0,008	0,0073	0,0042
V4.4	0,008	0,0032	0,0045	0,0077	0,0083	0,0096	0,0106	0,0096	0,0045
V4.5	0,018	0,0043	0,0051	0,0056	0,0058	0,0074	0,0053	0,0025	0,0022
V4.6	0,021	0,0031	0,0047	0,0068	0,0092	0,0117	0,0081	0,0052	0,0047
V4.7	0,006	0,0015	0,0034	0,0045	0,0086	0,0092	0,0114	0,0098	0,0062
V3.8	0,012	0,0018	0,0031	0,0038	0,0042	0,0079	0,0077	0,0065	0,004
V3.3	0,009	0,0016	0,0044	0,0047	0,0061	0,0074	0,008	0,0082	0,0033
V1.3	0,013	0,0022	0,0028	0,0034	0,0038	0,005	0,0056	0,005	0,0021
Ortalama	0,015	0,0032	0,0051	0,0061	0,0074	0,0092	0,0092	0,0082	0,004
V.K.	S.D.		Kareler ortalaması (KHA)			Kareler ortalaması		(PHB)	
Tekerrür	1		0,0004			0,00001			
Uygulama (U)	8		0,08**			0,29**			
Kontrol ve diğerleri	1		0,1**			0,14**			
Diğerleri	7		0,07**			0,31**			
Hata 1	8		0,002			0,0006			
İzolat (İ)	9		0,04*			0,01**			
İ x U	72		0,02*			0,005**			
Hata 2	161		0,0001			0,00003			

*, **: %5 ve %1'e göre önemli (sırasıyla)

mikroorganizmaların gelişimi, farklılık göstermektedir (Elsheikh ve Wood 1990). Rhizobial izolatların abiyotik strese dayanıklılıklarının farklı olduğu, tuz stresine maruz kaldıklarında ozmotik adaptasyon için farklı mekanizmaları kullandıkları bildirilmiştir (Arora ve ark.

2006). Tuza toleranslılığın, artan tuz düzeylerine toleranslı *Rhizobium* Frank izolatlarının nodül iletkenliğinin oksijenin yüksek stabilitesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Cordovilla ve ark. 1994, Ltaief ve ark. 2007).

Kurak bölge topraklarında yetişen baklagil kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* Frank bakterilerinin yüksek tuz konsantrasyonlarında geliştiği Singleton ve ark. (1982) ve Ventorino ve ark. (2012) tarafından rapor edilmiştir. Arora ve ark. (2006) ise; dört *Sinorhizobium* Scholla & Elkan izolatının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişmelerinde farklılık olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda farklı düzeylerde NaCl içeren ortamlarda izolatlarımızın gelişmelerinde belirlenen farklılık araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir.

İzolatların PHB üretimi, farklı tuz konsantrasyonlarında incelenmiş ve her bir tuz konsantrasyonlarında depoladıkları PHB içeriğinde farklılık saptanmıştır (Tablo 2). En yüksek PHB içeriği 400mM NaCl içeren ortamda V4.2 izolatında $0,0121\text{gl}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. İzolatlardan V4.6 izolatı 300mM'de ($0,0117\text{gl}^{-1}$) en yüksek PHB üretmiştir. V4.4 ($0,0106\text{gl}^{-1}$), V4.7 ($0,0114\text{gl}^{-1}$) ve V1.3 ($0,0056\text{gl}^{-1}$) izolatları ise 350mM NaCl içeren ortamda yüksek PHB üretmişlerdir (Tablo 2).

İzolatların PHB üretimi, farklı tuz konsantrasyonlarında incelenmiş ve her bir tuz konsantrasyonlarında depoladıkları PHB içeriğinde farklılık saptanmıştır (Tablo 2). En yüksek PHB içeriği 400mM NaCl içeren ortamda V4.2 izolatında $0,0121\text{gl}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. İzolatlardan V4.6 izolatı 300mM'de ($0,0117\text{gl}^{-1}$) en yüksek PHB üretmiştir. V4.4 ($0,0106\text{gl}^{-1}$), V4.7 ($0,0114\text{gl}^{-1}$) ve V1.3 ($0,0056\text{gl}^{-1}$) izolatları ise 350mM NaCl içeren ortamda yüksek PHB üretmişlerdir (Tablo 2). İzolatların tümünde en düşük PHB içeriği tuz içermeyen ortamda (kontrol) tespit edilmiştir. İzolatların depoladıkları PHB, ortamdaki tuz konsantrasyonuna ve izolata göre farklılık göstermiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında PHB içeriğindeki en yüksek artış; 250mM, 300mM, 350mM, 400mM ve 450mM NaCl içeren ortamlarda V4.7 nolu izolattan alınmıştır. Bu da, tuzlu koşullarda V4.7 bakteri izolatının PHB depolayabildiğini göstermektedir. Her bir izolatta PHB depolanması farklı tuz konsantrasyonlarında artmış, V4.2 izolatında ise en yüksek artış 400mM NaCl'de belirlenmiştir. İzolatların ürettiği PHB içerikleri ile geliştikleri ortamlarda yüksek ozmotik basınca tepki olarak biyopolimer sentezledikleri ve yüksek PHB üretilen tuz düzeyleri de izolatlar için optimum tuz konsantrasyonları olarak düşünülebilir. Bu değerleri daha iyi tahmin etmek için, ortamların optimizasyonları için ayrıntılı bir çalışma yapılması gerekmektedir. Belirli NaCl konsantrasyonlarında izolatlar tarafından üretilen PHB içeriklerinde düşüş meydana gelmiştir. Bu sonuç, PHB oluşumu için PHB biyosentez mekanizmasında inhibisyon oluşumunun meydana geldiğini göstermekte olup, artan tuz konsantrasyonu ile üretilen PHB içeriğinin düşük olması da ozmotik strese cevap olabilir.

PHB depolanmasının, tuza dayanıklı izolatlara göre değişiklik gösterebileceği açıklanmıştır (Ali ve ark. 2014, Arora ve ark. 2006, Kassem ve ark. 1985). Benzer olarak, tuz gölünden izole edilen *Bacillus megaterium* deBary uyuni S29 izolatının farklı tuz konsantrasyonları içeren ortamlardaki üreme durumları incelenmiştir (Rodriguez-

Contreras ve ark. 2016). S29 izolatı 45gl^{-1} NaCl, 100gl^{-1} NaCl ve 250gl^{-1} NaCl içeren ortamlarda gelişebilmiş ve PHB üretebilmişlerdir. Araştırmacılar tuz konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak biyomas ve PHB üretiminde bir azalma belirlemişlerdir (Rodriguez-Contreras ve ark. 2016). Araştırmacılar, S29 izolatının en iyi üreme gösterdiği 45gl^{-1} NaCl konsantrasyonunda en yüksek PHB depoladığını bildirmişlerdir. Yapılan bir araştırmada *Cupriavidus necator* Davis ve *Rhizobium* Frank DDSS-69'un maruz kaldıkları tuz stresi biyomas üretimlerini etkilememiş ve kontrole göre PHB depolanmasını arttırmıştır (Obruca ve ark. 2010). Çalışmamızda da artan tuz konsantrasyonlarında izolatlarımızın PHB içeriklerinde belirlenen artış, araştırmacıların sonuçları ile uyumludur.

Arora ve ark. (2006); yüksek ozmotik stres sırasında ortamda artan tuz düzeyinden dolayı, bakteriyal hücrelerin azot, potasyum veya diğer iyonları absorblamalarının zorlaşmasının hücre içinde PHB'nin depolanmaya başlamasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Kim ve ark. (1999) ise potasyumun azaldığı durumlarda bakteriyal hücrelerin PHB depoladıklarını yaptıkları çalışmalarında kanıtlamışlardır. Passanha ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, beş farklı (3, 5, 6, 5, 9, 12 ve 15gl^{-1}) NaCl konsantrasyonunun *Cupriavidus necator* Davis tarafından polialkonat (PHA) üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Ortamda tuz konsantrasyonunun artmasıyla, hücre içinde daha fazla miktarda PHB granülünün biriktiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada da Passanha ve ark. (2016)'nın bulgularına benzer olarak artan tuz konsantrasyonuna göre izolatlarda depolanmış PHB içeriklerindeki artış farklılık göstermiştir. Bu çalışmada araştırılan bakteri izolatları toplam kuru hücre ağırlığının %0,62-27'si arasında PHB üretmişlerdir (Tablo 3). Tuzlu koşullarda endofitik bakterilerden *Enterobacter aerogenens* Hormaeche & Edwards ET 101, *E. gergoviae* Hormaeche & Edwards ET 111, *E. aerogenens* Hormaeche & Edwards ET102 ve *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Frank'ın pirinç gelişimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bakteriyal izolatların ayrıca tuz içeren ortamda PHB ürettikleri saptanmıştır. Ozmotik koşullara toleranslı izolatların üretilen PHB %19,66-39,09 arasında değişiklik göstermiştir (Ali ve ark. 2014). Araştırmacılar özellikle en yüksek PHB üreten *E. aerogenens* Hormaeche & Edwards ET 101 izolatının tuzlu toprak koşullarında pirinç bitkisinin tuz stresine toleranslılığının artırılmasında etkili olduğunu belirlemişlerdir. Tablo 4'de farklı bakteri izolatlarının tuzlu içeren ortamlarda ürettikleri PHB miktarı verilmiştir. Üretilen PHB'nin bakteri türüne göre değişiklik gösterdiği ve aynı türün farklı izolatları arasında da PHB miktarının değiştiği görülmektedir (Tablo 4).

Sonuç olarak; yabani *Vicia aintabensis* kök nodül izolatlarının farklı konsantrasyonlardaki NaCl içeren ortamlarda gelişimleri farklılık göstermekle birlikte, yüksek tuz içeriği izolatların gelişmelerini sınırlandırmıştır. İzolatlar yüksek NaCl

Tablo 3. Farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen yabancı *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının PHB verimi (%).

İzolatlar	NaCl konsantrasyonları varlığında PHB verimi (%)								
	0mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM	350mM	400mM	450mM
V4.1	6,77	1,96	3,15	3,19	3,9	5,44	5,4	4,17	7,11
V4.2	6,92	1,13	2,47	2,9	3,64	3,94	4	4,17	11,67
V4.3	6,89	2	3,22	5,42	5,71	6,69	6,47	4,29	4,67
V4.4	3,33	1,45	2,14	3,85	4,15	4,8	7,1	10,7	5,63
V4.5	7,82	1,79	3,4	4,30	4,83	9,25	13,3	8,3	7,33
V4.6	9,54	1,47	2,94	4,85	7,67	7,3	27	26	23,5
V4.7	2,22	0,63	1,42	2,36	4,52	4,6	7,6	6,53	6,2
V3.8	4,8	0,75	1,40	1,58	2	3,7	5,5	5,90	4,44
V3.3	3,33	0,62	2,58	3,62	5,08	6,7	8	10,25	4,71
V1.3	10,83	1,16	1,56	2,83	3,17	4,2	5,6	8,33	10,5

Tablo 4. Farklı bakteri izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarındaki PHB üretimleri

PHB üretici izolatlar	Tuz düzeyi	Kuru hücre ağırlığı (gl ⁻¹)	PHB (gl ⁻¹)	Kaynak
<i>Sinorhizobium</i> JB1 Dangeard	700mM		0,00136	Arora ve ark. 2006
<i>S.meliloti</i> MTCC 3402 Dangeard	500mM		0,00121	Arora ve ark. 2006
<i>S.meliloti</i> RMP5 Dangeard	300mM		0,00115	Arora ve ark. 2006
<i>Sinorhizobium</i> sp. Dangeard	300mM		0,00091	Arora ve ark. 2006
<i>B.megaterium</i> uyuni S29 deBary	5gl ⁻¹	2,60	1,17	Rodriguez-Contreras ve ark. 2014
<i>B.megaterium</i> uyuni S29 deBary	45gl ⁻¹	5,42	2,22	Rodriguez-Contreras ve ark. 2014
<i>B.megaterium</i> uyuni S29 deBary	100gl ⁻¹	3,20	0,72	Rodriguez-Contreras ve ark. 2014
<i>Enterobacter aerogenens</i> Hormaeche & Edwards	8gl ⁻¹	1,10	0,430	Ali ve ark. 2014
<i>E.gergovise</i> Hormaeche & Edwards	8gl ⁻¹	1,15	0,422	Ali ve ark. 2014
<i>E.aerogenens</i> (L.) Hormaeche & Edwards	8gl ⁻¹	1,20	0,236	Ali ve ark. 2014
<i>R.leguminosarum</i> Frank	8gl ⁻¹	0,308	0,308	Ali ve ark. 2014
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.1	300mM	0,18	0,098	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.3	300mM	0,13	0,0087	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.5	300mM	0,08	0,0074	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.6	300mM	0,16	0,0117	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V3.8	300mM	0,21	0,0079	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.4	350mM	0,15	0,0106	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.7	350mM	0,15	0,0114	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V1.3	350mM	0,10	0,0056	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.2	400mM	0,29	0,0121	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V3.3	400mM	0,08	0,0082	Bu çalışmada
<i>Cupriavidus necator</i> Davis	2gl ⁻¹	10,1	6,36	Obruca ve ark. 2010
<i>C. necator</i> Davis	5gl ⁻¹	9,3	5,16	Obruca ve ark. 2010

konsantrasyonlarında en yüksek PHB sentezini yapmışlardır. İzolatların tümünde, kontrol (NaCl içermeyen) uygulamasında depolanan PHB içeriği, artan tuz düzeylerinde depolanan PHB içeriğine göre oldukça düşük bulunmuştur. Tuzlu koşullarda PHB depolamasının tuza toleranslı izolatlarla bağlı olduğu düşünülmektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, tuzlu koşullarda bakteriyel hücrelerin korunmasında PHB'nin rolünü

desteklemiştir. Tuzlu çevrelerde *Rhizobium* izolatlarının tuza toleranslı simbiyotik izolatları ile aşılama, konukçu baklagillerin strese toleranslılığını arttırabilecektir. Çalışmada test edilen izolatların tuzlu toprakların ıslahında da kullanılabileceği ve tuza toleranslı olan bu izolatların PHB üreterek canlılıklarını koruyabildikleri saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Abdelmoumen, H., Filali-Maltouf, A., Belabed, A. & Missbah El-Idrissi, M., 1999. Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 889–898.
2. Abdel-Wahab, H.H. & Zahran, H.H. 1979. Salt tolerance of *Rhizobium* species in broth culture. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 19: 681-685.
3. Aldal, H.K.H. 2016. Effect of different salt concentrations and pH on the growth of *Rhizobium* isolated from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *International Journal of Advanced Research*, 4: 444-448.
4. Ali, A., Shaban, K.A. & Tantawy, E.A. 2014. Effect of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) and glycogen producing endophytic bacteria on yield, growth and nutrient contents in rice cultivated in saline soil. *Applied Science Reports*, 8: 134-142.
5. Anderson, A.J. & Dawes, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54: 450-472.
6. Arora, N.K., Singhal, J. & Maheshwari, D.K. 2006. Salinity induced accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in rhizobia indicating its role in cell protection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 603-606.
7. Bonartseva, G.A. & Myshkina, V.L. 1985. Fluorescence intensity of strains of nodule bacteria (*Rhizobium meliloti*, *R. phaseoli*) different in activity, grown in the presence of the lipophilic vital strain phosphine R. *Translation of Microbiologiya*, 54(4): 535-541.
8. Charles, T.C., Cai, G.Q. & Aneja, P. 1997. Megaplasmid and chromosomal loci for the PHB degradation pathway in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Genetics*, 146:1211-1220.
9. Cordovilla, M.P., Ligerio, F. & Lluch, C. 1994. The effect of salinity on N₂ fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, 45:1483-1488.
10. Çullu, M.A. 2011. *Toprak tuzlulaşması. T.C. Kalkınma Bakanlığı Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı, Şanlıurfa* 96 sayfa.
11. El-Mokadem, E.A.E., Helemis, F.A., Abdel-Wahab, S.M. & Abou-El-Nour, M.M. 1991. Salt response of clover and alfalfa inoculated with salt tolerant strains of *Rhizobium*. *Ain Shams Science Bulletin*, 28: 441-468.
12. El-Sheikh, E.A.E. & Wood, M. 1990. Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*, 22: 343-347.
13. El-Sheikh, E.A.E. & Wood, M. 1995. Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 27: 657-661.
14. Fauturi, M.Y., El-Mahi, Y.E. & El-Hassan, G.A. 2001. Effects of some salts and sodicity on the growth of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain isolated from a salt affected soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 807-812.
15. Gorji, T., Tanık, A. & Sertel, E. 2015. Soil salinity prediction, monitoring and mapping using modern Technologies. *Procedia Earth and Planetary Science*, 15:507-512.
16. Hua, S.T., Tsai, V.Y., Lichens, G.M. & Noma, A.T. 1982. Accumulation of aminoacids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 135-140.
17. Jordan, D.C. 1984. *Genus I. Rhizobium Frank 1889. In: Krieg, NR, Holt JG (Eds.), Bergeys Manual of Systemic Bacteriology*, Vol.1 Williams & Wilkins, Baltimore, pp 136-139.
18. Junior, P.I.F., de Oliveira, P.J., Rumjanek, N.G. & Xavier, G.R. 2011. Poly-β-hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) root nodules. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 163: 473-484.
19. Kassem, M., Cappelano, A. & Gounot, A.M. 1985. Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficiency de *Rhizobium meliloti*. *Mircen Journal*, 1: 63 75.
20. Kim, J., Shin, T.K., Choi, H.J. & Jhon, M.S. 1999. Miscibility of biodegradable synthetic aliphatic polyester and poly(epichlorohydrin) blends. *Polymer*, 40: 6873–6876.
21. Küçük, Ç., Cevheri, C. & Çetin, E. 2011. Şanlıurfa'daki doğal baklagillerin *Rhizobium* potansiyellerinin belirlenmesi. Sayfa 445-452. I. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi ve Fuarı Bildiriler Kitabı 27-30 Nisan 2011, Eskişehir.
22. Lakshmi, R.S., Hema, T.A., Divya, T.R. & Starin, S.T. 2012. Production and optimization of polyhydroxybutyrate from *Rhizobium* sp. present in root nodules. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 3: 21-25.
23. Ltaief, B., Sifi, B., Zaman-Allah, M., Drevon, J. & Lachaal, M. 2007 Effect of salinity on root–nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum*–*Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *Journal Plant Physiology*, 164:1028–1036.
24. Mashhady, A.S., Salem, S.H., Barakh, F.N. & Heggo, A.M. 1998. Effect of salinity on survival and symbiotic

- performance between *Rhizobium meliloti* and *Medicago sativa* in Arabian soils. *Arid Soil Research Rehabilitation*, 12: 3-14.
25. Obruca, S., Marova, I., Svoboda, Z. & Mikulikova, R. 2010. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiology*, 55: 17-22.
 26. Passanha P., Kedia, G., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. & Esteves, S.R. 2014. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 163: 287–294.
 27. Rodriguez-Contreras, A., Koller, M., Braunegg, G., & Marquez-Calvo, M.S. 2016. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*, 33: 73-77.
 28. Sauvage, D., Hamelin, J. & Larher, F. 1983 Glycine betaine and other structurally related compounds improve the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Plant Science Letters*, 31: 291-302.
 29. Singleton, P.W., Singleton, S.A., El-swaifi, B.B. & Bohlool, B. 1982. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Applied Environmental Microbiology*, 44: 884–890.
 30. Stam, H., van Verseveld, H.W., de Vries, W. & Stouthamer, A.H. 1986. Utilisation of poly- β -hydroxybutyrate in free living cultures of *Rhizobium* ORS571. *FEMS Microbiology Letters*, 35: 215-220.
 31. Tate, R.L. 1995. *Soil Microbiology (Symbiotic Nitrogen Fixation)*, p. 307-333. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
 32. Tombolini, R. & Nuti, M.P. 1989. Poly-(β -hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. *FEMS Microbiology Letters*, 60: 299-304.
 33. Ventorino, V., Caputo, R., De Pascale, S., Fagnano, M., Pepe, O. & Moschetti, G. 2012. Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. *Annals of Microbiology*, 62: 811-823.
 34. Yurtsever, N. 1984. *Deneyisel istatistik metodları*. Tarım Orman ve Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Yayın No: 121, 623 sayfa, Ankara.
 35. Zahran, H.H. 1991. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology Fertility Soils*, 12:73-80.
 36. Zahran, H.H. & Sprent, J.I. 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303-309.

DETERMINATION OF CONTROL POTENTIALS AND ENZYME ACTIVITIES OF *Beauveria bassiana* (BALS.) VULL. ISOLATES AGAINST *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE)

Serkan ÖRTÜCÜ^{1*}, Nurcan ALBAYRAK İSKENDER²

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Erzurum Technical University, Erzurum

² Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, Artvin Coruh University, Artvin

*Corresponding author: e-mail: serkan.ortucu@erzurum.edu.tr

Received (Alınış): 12 January 2017, Accepted (Kabul): 15 March 2017, Online First (Erken Görünüm): 8 April 2017, Published (Basım): 15 June 2017

Abstract: Broad host range of entomopathogenic fungi may have a commercial advantage for biological control industry. In addition, all entomopathogenic fungi rely on a combination of different enzymes to penetrate their hosts and these enzymes play an important role in the host range of fungal isolates. The aim of this study is to determine the potential of three *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. isolates in control of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and to determine their lipase, chitinase, and protease activities. For this purpose, *B. bassiana* (PaF04, PaF09 and PaF76) isolates, which was previously demonstrated to have entomopathogenic activity against Coleoptera, Lepidoptera, and Hymenoptera were chosen. *T. urticae* was used as the test organisms. Three different suspensions (1×10^6 , 1×10^7 and 1×10^8 conidia ml⁻¹) were prepared in Tween 80. 2ml suspension of a single dose was sprayed onto down sides of bean leaf discs using hand sprayer. Mortality rates of *T. urticae*, in terms of LT50 values, were recorded daily for 5 days. Enzyme activities were investigated by petri plate assays and clear zones formed around the colonies indicated enzymatic activities. All tested fungal isolates were pathogenic to the *T. urticae* causing mortality between 64.2±5.6% and 100% on the 5th day after the application. LT50 values varied between 3.16±0.2 and 3.72±0.5 days. Mortality caused by PaF04 isolate was found to be significantly different ($p < 0.05$). In conclusion, PaF isolates of *B. bassiana* have been determined to have potential to suppress *T. urticae*, in addition to their potential in control of Coleoptera, Lepidoptera, and Hymenoptera. The present results showed that the isolates used, especially PaF04, have a broad host range.

Key words: *Beauveria bassiana*, broad host range, *Tetranychus urticae*, enzyme activity.

Beauveria bassiana (Bals.) Vull. İzolatlarının *Tetranychus urticae* Koch'a (Acari: Tetranychidae) Karşı Kontrol Potansiyellerinin ve Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Özet: Entomopatojen fungusların geniş konukçu çeşitliliği biyolojik mücadele endüstrisi için ticari bir avantaj olabilir. Bununla birlikte, entomopatojen fungusların tümü konukçuya nüfuz etmek için çeşitli enzimlerinin kombinasyonlarını kullanır ve bu enzimler fungal izolatların konukçu çeşitliliğinde önemli bir rol oynar. Bu çalışmanın amacı, üç *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. izolatının *Tetranychus urticae* Koch'a (Acari: Tetranychidae) karşı kontrol potansiyellerinin ve lipaz, kitinaz ve proteaz enzim aktivitelerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, daha önce Coleoptera, Lepidoptera ve Hymenoptera'ya karşı entomopatojenik aktivite gösteren *B. bassiana* (PaF04, PaF09 ve PaF76) izolatları seçilmiştir. Test organizması olarak, *T. urticae* kullanılmıştır. Üç farklı dozda süspansiyon (1×10^6 , 1×10^7 ve 1×10^8 konidi ml⁻¹) Tween 80'de hazırlanmıştır. 2ml tek doz spor süspansiyonu el spreyi kullanılarak fasülye yaprak disklerinin alt yüzüne püskürtülmüştür. *T. urticae*'nin ölüm oranları 5 gün boyunca günlük olarak kaydedilmiştir. Enzim aktiviteleri petri plate yöntemi ile araştırılmış ve koloni çevresinde oluşan açık zonlar, enzim aktivitenin varlığını göstermiştir. Test edilen tüm fungus izolatları uygulamadan 5 gün sonra, 64,2±5,6% ve 100% arasında mortaliteye yol açarak *T. urticae*'ye karşı patojenite göstermiştir. LT50 değerleri 3,16±0,2 ve 3,72±0,5 gün arasında değişmiştir. PaF04 izolatının neden olduğu mortalite önemli derecede farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). Sonuçta, *B. bassiana* PaF izolatlarının Coleoptera, Lepidoptera ve Hymenoptera'yı kontrol potansiyellerinin olduğu kadar *T. urticae*'yi baskılama potansiyeline de sahip oldukları belirlenmiştir. Mevcut sonuçlar, kullanılan izolatların, özellikle de PaF04'ün geniş bir konukçu aralığına sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Beauveria bassiana*, geniş konukçu aralığı, *Tetranychus urticae*, enzim aktivitesi.

Introduction

Entomopathogenic fungi are considered to be one of the promising biological control agents (St Leger *et al.* 1996). *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull., a fungal species

naturally growing in soils and acting as a parasite on various arthropod species, has a potential to be used against both insect pests and plant pathogens. However,

no data was reported about phytopathogenic activity of this fungal species (Clarkson & Charnley 1996, Ownley *et al.* 2004, 2008).

The two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch is a worldwide economically important major pest of agriculture (Numa Vergel *et al.* 2011) and has been a serious problem due to insecticide use. The use of entomopathogen fungi has been an increasingly popular option to control mites and suppress their populations (Zhang 2003). In recent years, a growing interest about using *Beauveria* spp. in mite control applications occurred (Shi & Feng, 2004, Alves *et al.* 2005, Bugeme *et al.* 2008). Laboratory studies revealed that *B. bassiana* as an effective pathogen of *T. urticae* (Irigaray *et al.* 2003, Bugeme *et al.* 2009, Draganova & Simova 2010, Geroh *et al.* 2015).

B. bassiana is known to have a potential to control more than 70 insect pests, but most of the studies evaluating infection have focused on phytophagous hosts, most of which are Arthropoda members (Feng *et al.* 1994, Roy *et al.* 2006, van Lenteren 2012). *Beauveria* genus was shown to be affective against members of the insect orders Coleoptera, Lepidoptera, and Hymenoptera (Hatting *et al.* 2004).

The commercial production of mycoinsecticides has been a successful and environmentally safe alternative to insecticides. However, acceptance of these products has been limited when compared with conventional chemical products because they are not acting on pest species as fast as chemical products (Leger & Screen 2001, Sevim 2015). Narrow host range of mycoinsecticides is also one of the factors limiting their commercial use (Ownley *et al.* 2004). However, a mycoinsecticide including entomopathogenic fungi with a broad host range may have a commercial advantage over others (Brodeur 2012).

B. bassiana has an extremely broad host range and uses a combination of cuticle-degrading enzymes for degradation of and penetration into the host cuticle (Butt 2002, Meyling *et al.* 2009, Ortiz-Urquiza & Keyhani 2013). These enzymes including lipase, chitinase and protease may determine not only the virulence but also the host range of fungal isolates (Gupta *et al.* 1994, Butt 2002).

Some studies indicated that strains of entomopathogenic fungi can be more virulent to pests than the same or related host species that they were isolated from (Goettel *et al.* 1990, Ekesi *et al.* 2000, Shaw *et al.* 2002). Besides, pathogens that are not associated with a host in nature can be tested for their pathogenicity (Wekesa *et al.* 2005).

In the present study, we selected three native *B. bassiana* isolates, which were previously demonstrated to be active against Coleoptera (Albayrak İskender *et al.* 2013), Lepidoptera (Albayrak İskender *et al.* 2012), and Hymenoptera (Albayrak İskender *et al.* 2017), and evaluated their pathogenicity potentials towards *T. urticae* (Acari) considering their extremely broad host range.

Materials and Methods

Biological material and history of isolates

PaF04, PaF09 and PaF76 isolates of *B. bassiana* were used in this study. These isolates, previously isolated from *Pristiphora abietina* (Christ) larvae, were shown to be highly pathogen on different insect species and are deposited within the GenBank database with accession numbers KT962854, KT962855, and KT962857 respectively. A history of each isolates was given in Table 1. *T. urticae* was reared, as the target organisms, on bean plants at 25±1 °C and 60±5% relative humidity (RH) with a 12:12h (L:D) photoperiod.

Conidial suspension and viability

The isolates were cultured in Potato Dextrose Agar (PDA) containing 2% yeast extract and kept for two weeks at 25 °C for conidial production. Conidia were suspended in sterile distilled water, a surfactant (0.2ml/l Tween 80) was added to reduce clumping of the conidia, and the suspension was vortexed to produce a homogenous state (Belczewski & Harmsen 2000). The prepared suspensions were then filtrated through three layers of muslin to eliminate hyphae and unsuspended conidia. The spore concentrations were determined using a haemocytometer and suspensions were prepared in logarithmic series from 1x10⁶ to 1x10⁸ (Eken & Hayat 2009).

Conidial viability was tested in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plates. Droplets were taken from suspensions in sterile conditions and spread over the SDA medium. After 24h, percent germination was determined from 100 spore counts on each plate (Ekesi *et al.* 2000). Only conidia with a germ tube as long as the conidium's width were considered to be germinated. Spore suspensions were sealed with Parafilm and kept at 4 °C in a refrigerator until use (Safavi *et al.* 2010).

Bioassays

Effect of conidial concentration on pathogenicity

Three different preparations, 1x10⁶, 1x10⁷ and 1x10⁸, each supplied with 0.02% Tween 80, were tested. 2ml suspension of a single dose was sprayed onto down side of bean leaf discs (30mm diameter) using a hand sprayer. The leaf discs were air dried and placed in Petri dishes (Quesada-Moraga *et al.* 2006). Distilled water containing 0.02% Tween 80 was used as control. Twenty vigorous adult mites arbitrarily taken from the reared population were transferred to each disc by means of a fine soft brush (Kady *et al.* 2007). After exposure, all petri dishes were sealed with Parafilm and the lids were provided with holes of 6 mm diameter for proper ventilation.

All petri dishes were incubated at 25±1 °C and 65±5% RH. Mortality was recorded on daily basis for a period of 5 days. Dead mites were surface sterilized in 70% ethanol, dried and transferred to Petri dishes lined with moist filter paper for 10 days to observe mycosis. Mortality caused by fungi was confirmed by microscopic examination (Cherry *et al.* 2005).

Table 1. History of the isolates used in this study.

Host	Order	Application	Dose (conidia/ml)	Mortality (%) (5 th day after application)			Reference
				PaF04	PaF09	PaF76	
<i>P. abietina</i> larvae	Hymenoptera	Immersing	10 ⁶	48.2±8.9b	80±6.4a	72.8±7.7ab	(Albayrak Iskender <i>et al.</i> 2017)
<i>H. cunea</i> larvae	Lepidoptera	Immersing	10 ⁶	96.66±3.33a	90±5.77a	96.66±3.33a	(Albayrak Iskender <i>et al.</i> 2012)
<i>D. micans</i> larvae	Coleoptera	Immersing	10 ⁹	100a	100a	100a	(Albayrak Iskender <i>et al.</i> 2013)

In-vitro enzyme plate assays

B. bassiana isolates were tested for qualitative analysis of chitinase, protease and lipase enzymes by measured clear zone. For analysis of the lipolytic activity, the medium described by Sierra (1957) was used. Olive oil was used as the lipid substrate. For analysis of the proteolytic activity, casein soluble medium with milk powder was used. For the chitinolytic activity, medium-5 as described by Abd-Aziz *et al.* (2008) was used with addition of agar. An agar disk (6mm in diameter) from 7-old day fungal culture was placed in the center of these agar plates and the inoculated plates were incubated at 28°C for 10 days. Clear zones formed around the colonies indicated degradation of the substrate due to enzymatic activity. Zone formations in the protease activity were enhanced by flooding the plates with 10% glacial acetic acid.

Statistical analysis

The experimental design was a randomized complete block with three replicates, and each replicate consisted of 20 mites. The analysis of variance was conducted using one-way ANOVA test using SPSS 13.0. LT50 was determined graphically for mortality (Alves *et al.* 2005).

Results

This study determined pathogenicity of *B. bassiana* against *T. urticae* under laboratory conditions. In viability tests, 95–100% of the spores germinated and all tested fungal isolates were pathogenic to the *T. urticae*, causing a mortality rate between 64.2±5.6% and 100% after 5 days from application. Microscopic investigations confirmed mycosis for all dead mites, and *B. bassiana* was reisolated from all dead individuals. LT50 values varied between 3.16±0.2 and 3.72±0.5 days. Mortality caused by PaF04 isolate was found to be significantly different (p<0.05) between all preparations. For this isolate, the lowest *B.*

bassiana concentration (1x10⁶ conidia/ml) gave less control (80.7±4.2%) of the mites until the 5th day after inoculation. By comparison, the intermediate concentration (1x10⁷ conidia/ml) caused a mortality with 92±3.5%, and the best results were obtained with the highest conidial concentrations (1x10⁸ conidia/ml) with which a high control (100%) of the mites were achieved. PaF04 isolate was consistently more virulent than PaF09 and PaF76 isolates for all preparations. PaF09 isolate showed a virulence similar to that of PaF76 (p<0.05) except for 1x10⁷ conidia/ml. LT50 values of these three isolates changed between 3.16 and 3.72 days (Table 2).

Discussion

B. bassiana isolate PaF04 was consistently more virulent than PaF09 and PaF76 isolates for all preparations. Mortality of the target organism *T. urticae* was found to increase with time (data not shown) and was dependent on spore concentration. PaF04 isolate led to the shortest LT50 value with 3.16 days. This value was significantly (P>0.05) shorter than LT50 values obtained with PaF09 and PaF76 isolates. Albayrak Iskender *et al.* (2012) compared the virulence of the same isolates against *H. cunea* larvae and found that their virulence was similar (P>0.05). Furthermore, Albayrak Iskender *et al.* (2017) reported that these isolates were pathogenic against *P. abietina* larvae as well, but the levels of virulence were different among the isolates (P>0.05).

They also reported that PaF09 isolate was highly virulent to *P. abietina* larvae, and all PaF04, PaF09 and PaF76 isolates possessed a good potential against *H. cunea* and *D. micans* larvae. Nevertheless, in our study, only PaF04 isolate was shown to have a potential to control *T. urticae*. Our results which indicated a poor potential for PaF09 and PaF76 against *T. urticae* might

Table 2. Mortality of *T. urticae* within 5 days after application of fungal isolates and the enzyme activities of the isolates in terms of clear zone evaluations on agar plates (p<0.05±SE)*.

Isolates	65±5%RH			LT50 (days)	Enzyme activity (mm)		
	Conidial suspension				Lipase	Protease	Chitinase
	1x10 ⁶	1x10 ⁷	1x10 ⁸				
PaF04	80.7±4.2 ^a	92±3.5 ^a	100 ^a	3.16±0.2	ND**	4.5±0.5 ^a	6±2 ^a
PaF09	67.6±6.3 ^b	83.4±2.2 ^b	89.8±3.3 ^b	3.52±0.3	2±0.4 ^c	5±0.5 ^a	1±0.5 ^c
PaF76	64.2±5.6 ^b	77.8±4.2 ^c	90.1±1.1 ^b	3.72±0.5	5±1 ^a	4±0.7 ^a	ND**

* The differences between the values indicated by the same letters (used as superscript) in the same column are not statistically significant (p≤0.05), **ND: Not determined.

be due to the experimental method employed, to the type of the host and host stage because all these parameters are known to affect the results of bioassays (Mascarin *et al.* 2013).

When the lipase and protease activities values of PaF76 isolate were compared, the clear zone for lipase activity was (5±1mm) appeared to be higher than its protease-originated clear zone (4±0.7mm). The obtained results indicated that mortality effect of PaF76 on *T. urticae* was too low. Extracellular lipases are involved in microbial virulence and play different roles in infection processes (Stehr *et al.* 2003). Khan *et al.* (2012) reported that lipase was the most important enzyme for virulence as compared to chitinase and protease. The differences of the hosts and isolates used might be the factors leading to differences in mortality results obtained (Clarkson & Charnley 1996). In addition, the developmental stage of the host organism might also be a reason of differences in mortality. PaF04 isolate possessed the highest chitinase activity. This isolate was consistently more virulent than PaF09 and PaF76 isolates in this study. Previous studies have shown that enzymatic activities based on chitinase and protease played important roles in mortality of pest in the presence of entomopathogens (St Leger *et al.* 1996, Campos *et al.* 2005). Similarly, Khan *et al.* (2012) reported that protease was found to be effective in the pathogenicity of *B. bassiana*. We therefore conclude that PaF04 isolate could be used as potential control

agent on a variety of target organisms, considering its broad host range.

It is well known that host specificity has been a critical issue in biological control studies and the first step in the selection of biological control agent candidate. Furthermore, narrow host range can be a limiting factor for the commercialization of entomopathogens (Waage 2001, Brodeur 2012). Entomopathogens such as *B. bassiana* used in biological control has the capacity to exploit a wide range of hosts (Charnley & Collins 2007, Bugeme *et al.* 2008).

The three *B. bassiana* isolates used in the present study are fungal agents which have previously been to be pathogenic against various insects (for *P. abietina* larvae see Albayrak İskender *et al.* 2017, for *H. cunea* larvae see Albayrak İskender *et al.* 2012, and for *D. micans* larvae see Albayrak İskender *et al.* 2013). Here, we showed their pathogenicity potentials on the agricultural pest *T. urticae* based on qualitative analysis of their enzyme activities which could be related to pathogenicity (Feng & Johnson 1990). Our findings are important to fundamentally understand the host-fungus relationships and may also be useful for selection of these organisms for biological control applications. In conclusion, PaF isolates of *B. bassiana* were proven to have a potential to control Coleoptera, Lepidoptera, and Hymenoptera as well as *T. urticae*.

References

1. Abd-Aziz, S., Sin, T.L., Alitheen, N., Shahab, N. & Kamaruddin, K. 2008. Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. *Journal of Biological Sciences*, 8(1): 52–59.
2. Albayrak İskender, N., Örtücü, S., Aksu, Y. & Saral, A. 2017. Isolation, characterization and pathogenicity of fungi from *Pristiphora abietina* (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(1a): 628–633.
3. Albayrak İskender, N., Örtücü, S., Kılıç, E. & Aksu, Y. 2013. Assessment of *Beauveria bassiana* strains isolated from various insects to control *Dendroctonus micans* (Kugel.) larvae, 4th International Participated Entomopathogens and Microbial Control Symposium, 11-14 September, Artvin, 97.
4. Albayrak İskender, N., Örtücü, S. & Aksu, Y. 2012. Pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* to control *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) larvae. *Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 13: 15–21.
5. Alves, S.B., Tamai, M.A., Rossi, L.S. & Castiglioni, E. 2005. *Beauveria bassiana* pathogenicity to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. *Experimental and Applied Acarology*, 37(1–2): 117–122.
6. Belczewski, R. & Harmsen, R. 2000. The effect of non-pathogenic phylloplane fungi on life-history traits of *urticae* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 24(4): 257–270.
7. Brodeur, J. 2012. Host specificity in biological control: Insights from opportunistic pathogens. *Evolutionary Applications*, 5(5): 470–480.
8. Bugeme, D.M., Knapp, M., Boga, H.I., Wanjoya, A.K. & Maniania, N.K. 2009. Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Mycopathologia*, 167(4): 221–227.
9. Bugeme, D.M., Maniania, N.K., Knapp, M. & Boga, H.I. 2008. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology*, 46(1–4): 275–285.
10. Butt, T.M. 2002. Use of Entomogenous Fungi for the Control of Insect Pests, 111–134. in: (Kempken, F.), *Agricultural Applications*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 388.
11. Campos, R.A., Arruda, W., Boldo, J.T., Silva, M.V., de Barros, N.M., de Azevedo, J.L., Schrank, A. & Vainstein, M.H. 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorphae* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*, 50(5): 257–261.
12. Charnley, A.K. & Collins, S.A. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control, 159–187. in (Kubicek,

- C.P. & Druzhinina, I.S.), *Environmental and Microbial Relationships*, Heidelberg: Springer, Berlin, 350.
13. Cherry, A.J., Abalo, P. & Hell, K. 2005. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*, 41(3): 295–309.
 14. Clarkson, J.M. & Charnley, A.K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4(5): 197–203.
 15. Draganova, S.A. & Simova, S.A. 2010. Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae) to isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Pesticides and Phytomedicine*, 25(1): 51–57.
 16. Eken, C. & Hayat, R. 2009. Preliminary evaluation of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries in laboratory conditions, as a potential candidate for biocontrol of *Tetranychus urticae* Koch. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3): 489–492.
 17. Ekesi, S., Maniania, N. K. & Lwande, W. 2000. Susceptibility of the legume flower thrips to *Metarhizium anisopliae* on different varieties of cowpea. *BioControl*, 45(1): 79–95.
 18. Feng, M.G. & Johnson, J.B. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 19: 3(3): 785–790.
 19. Feng, M.G., Poprawski, T.J. & Khachatourians, G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4(1): 3–34.
 20. Geroh, M., Gulati, R. & Tehri, K. 2015. Determination of lethal concentration and lethal time of entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Tetranychus urticae* Koch. *International Journal of Agriculture Sciences*, 7(5): 523–528.
 21. Goettel, M.S., Poprawski, T.J., Vandenberg, J.D. & Roberts, D.W. 1990. Safety to non target invertebrates of fungal biocontrol agents, 209–231. in (Laird, M., Lacey, L. & Davidson, E.), *Safety of Microbial Insecticides*, CRC Press, Boca Raton, 272.
 22. Gupta, S.C., Leathers, T.D., Elsayed, G.N. & Ignoffo, C.M. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(1): 13–17.
 23. Hatting, J.L., Wraight, S.P. & Miller, R.M. 2004. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) for control of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on resistant wheat under field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 14(5): 459–473.
 24. Kady, G.A., Sharabasy, H.M., Mahmoud, M.F., Bahgat, I.M. & Said, P. 2007. Toxicity of two potential bio-insecticides against moveable stages of *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Sciences*, 3(11): 1315–1319.
 25. Khan, S., Guo, L., Shi, H., Mijit, M. & Qiu, D. 2012. Bioassay and enzymatic comparison of six entomopathogenic fungal isolates for virulence or toxicity against green peach aphids *Myzus persicae*. *African Journal of Biotechnology*, 11(77): 14193–14203.
 26. Leger, R.S. & Screen, S. 2001. Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds, 219–237. in: (Butt, T., Jackson, C. & Magan, N.), *Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential*, CABI, Wallingford, 416.
 27. van Lenteren, J.C. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57(1): 1–20.
 28. Mascarin, G.M., Kobori, N.N., Quintela, E.D. & Delalibera, I. 2013. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological Control*, 66(3): 209–218.
 29. Meyling, N., Lubeck, M., Buckley, E., Eilenberg, J. & Rehner, S. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology*, 18(6): 1282–1293.
 30. Numa Vergel, S.J., Bustos, R.A., Rodríguez, C.D. & Cantor, R.F. 2011. Laboratory and greenhouse evaluation of the entomopathogenic fungi and garlic-pepper extract on the predatory mites, *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus* and their effect on the spider mite *Tetranychus urticae*. *Biological Control*, 57(2): 143–149.
 31. Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3): 357–374.
 32. Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W.E., Gwinn, K.D., Moulton, J.K. & Pereira, R.M. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3): 267–270.
 33. Ownley, B.H., Pereira, R.M., Klingeman, W.E., Quigley, N.B. & Leckie, B.M. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens, 255–269. in: (Lartey, R. & Caesar, A.), *Emerging Concepts in Plant Health Management*, Research Signpost, Kerala, 298.
 34. Quesada-Moraga, E., Maranhao, E.A.A., Valverde-García, P. & Santiago-Álvarez, C. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control*, 36(3): 274–287.
 35. Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E. & Pell, J.K. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*, 51(1): 331–357.
 36. Irigaray, F.J., Marco-Mancebón, V. & Pérez-Moreno, I. 2003. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its compatibility with triflumuron: effects on the twospotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biological Control*, 26(2): 168–173.

37. Safavi, S.A., Kharrazi, A., Rasoulia, G.R. & Bandani, A.R. 2010. Virulence of some isolates of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12(1): 13–21.
38. Sevim, A. 2015. Entomopatogenik fungusların genel biyolojileri ve Türkiye’de zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılma potansiyelleri. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1): 115-147.
39. Shaw, K.E., Davidson, G., Clark, S.J., Ball, B.V., Pell, J.K., Chandler, D. & Sunderland, K.D. 2002. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. *Biological Control*, 24(3): 266–276.
40. Shi, W. & Feng, M. 2004. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biological Control*, 30(2): 165–173.
41. Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23(1): 15–22.
42. St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M.J. & Roberts, D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13): 6349–6354.
43. Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B. & Schäfer, W. 2003. Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(5): 347–355.
44. Waage, J. K. 2001. Indirect ecological effects in biological control: the challenge and the opportunity, 1–12, in: (Wajnberg, E., Scott, J. & Quimby, P.), *Evaluating Indirect Ecological Effects of Biological Control*, CAB International, Wallingford, 261.
45. Wekesa, V.W., Maniania, N.K., Knapp, M. & Boga, H.I. 2005. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental & applied acarology*, 36(1–2): 41–50.
46. Zhang, Z. 2003. *Mites of Greenhouses: Identification, Biology and Control*. CABI Publishing, Oxon, 240.

A NEW HOST SPECIES FOR *Uromyces behenis* (DC.) UNGER

Hasan AKGÜL¹, Mustafa SEVİNDİK¹, Şanlı KABAKTEPE^{*2}, Ayşen ÖZÇANDIR¹, Candan KEMALOĞLU AYKURT¹, İlğaz AKATA³

¹Akdeniz University, Science Faculty, Department of Biology, Antalya.

²Inonu University, Battalgazi Vocat Sch, TR-44210 Battalgazi, Malatya.

³Ankara University, Science Faculty, Department of Biology, Ankara.

*Corresponding author: e-mail: sanli.kabaktepe@inonu.edu.tr

Received (Alınış): 24 November 2016, Accepted (Kabul): 16 March 2017, Online First (Erken Görünüm): 8 April 2017, Published (Basım): 15 June 2017

Abstract: In this study, *Silene echinospermoides* Hub.-Mor. (*Caryophyllaceae*) is reported as a new host species for the rust fungus *Uromyces behenis* (DC.) Unger. A short description, distribution and photographs of macro- and micromorphological features of the fungus were given.

Key words: *Uromyces*, rust fungi, new host, Turkey.

Uromyces behenis (DC.) Unger İçin Yeni Bir Konakçı Tür

Özet: Bu çalışmada, *Silene echinospermoides* Hub.-Mor. (*Caryophyllaceae*), *Uromyces behenis* (DC.) Unger pas mantarı türü için yeni bir konakçı tür olarak rapor edilmiştir. Bu fungusun kısa deskripsiyonu, yayılışı ve makro ve mikromorfolojilerine ait fotoğrafları verilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Uromyces*, pas mantarları, yeni konak, Türkiye.

Introduction

Silene L. is one of the largest genera of flowering plants in the world, comprising ca. 750 species of which approximately half occur in the Mediterranean basin. The southern parts of Balkan Peninsula and southwest Asia are the two main centers for the genus (Greuter 1995). *Silene* is represented in Turkey by 31 sections and 138 species, of which 42% are endemic taxa (Genç *et al.* 2007).

Rust species recorded so far on *Silene* as the host belong to the genera *Aecidium* Pers., *Puccinia* Pers. and *Uromyces* (Link) Unger. *Uromyces* is known to include 12 species worldwide which rely on *Silene* species and 5 of these species were determined in Turkey by Bahçecioğlu & Kabaktepe (2012).

In the present study, a new host *Silene* species, *S. echinospermoides*, was reported for the rust fungus *Uromyces behenis*, contributing to its host range of.

Materials and Methods

Fungi samples and the host plants were collected in 2016 from Antalya province in Turkey. The host specimens were prepared according to the conventional herbarium techniques. Host plants were identified using the Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Cullen & Coode 1967). Fungal spores were scraped from dried host specimens and mounted in lactophenol.

Microphotographs of the spores were taken under a light microscope (Noveks B series 1000). The current names of fungi were given according to www.indexfungorum.org. Names of host plants and families are given according to <http://www.theplantlist.org>. Voucher specimens are deposited in İnönü University Herbarium (INU).

Results

The identification of the fungal samples showed that the fungus sampled on *S. echinospermoides* was *Uromyces behenis* (DC.) Unger, Einfluss des Bodenstc.: 216 (1836). (Fig. 1). Macro- and micromorphological features of the fungus were given below.

Aecidia usually hypophyllous, seated on spots that vary in size and yellow or purple. It is very conspicuous, solitary or clustered, cup shaped, whitish yellow. Aecidiospores densely and minutely verruculose, yellowish, 15-21µm in diam. Uredinia aecidioid. Teleutosori hypophyllous and on the stems, often mixed with uredinia, scattered, gregarious or circinate, covered by epidermis, brownish black or black. Teleutospores subglobose or obovoid, rounded above 25-37 × 19-27µm, wall smooth, pale brown, up to 1µm at apex, pore apical, pedicels up to 80µm, faintly yellowish, persistent.



Fig. 1. Images of the rust fungus *Uromyces behenis* and the host species *Silene echinospermoides*. A- a general view of the dried herbarium specimen of the host; B- stereo microscopic view of the infected host plant; C- light microscopic view of Aecidiaspores; D- light microscopic view of Teleutospores.

Table 1. Host range and distribution of *Uromyces behenis* in Turkey.

Host	Distribution in Turkey	References
<i>Silene</i> spp.	Kahramanmaraş	(Bahçecioglu et al. 2006, Gobelez 1962)
<i>Silene alba</i> Muhl. ex Rohrb.	Kars, Ardahan	(Bahçecioglu & Kabaktepe 2012)
<i>Silene echinospermoides</i> Hub.-Mor.	Antalya	The record reported in the present study
<i>Silene italica</i> (L.) Pers.	Sivas	(Bahçecioglu & Yıldız 2005)
<i>Silene marschallii</i> C. A. Mey.	Erzurum	(Henderson 1964, Tamer et al. 1989)
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke	Sivas, Ordu	(Bahçecioglu & Yıldız 2005, Kabaktepe & Bahçecioglu 2006).

Specimen examined: *Silene echinospermoides* Hub.-Mor. (*Caryophyllaceae*), Turkey, Antalya, Kumluca, Yukarı Alakır, 1200m. 30/05/2016, A. Özçandır 1454.

Discussion

Uromyces behenis, known as the yellow champion rust on *Silene*, is a common rust fungi widespread in Europe and Asia and was recorded so far on 25 different

Silene species (Farr & Rossman 2016). It was also reported on *Oberna cserei* (*Caryophyllaceae*) Ikonn. from Ukraine (Dudka et al. 2004). The yellow champion name comes from aecidia on the host plant. *U. behensis* is known found to infect 5 *Silene* taxa in Turkey (Table 1). As a result of this study, the number of *Silene* species serving as a host for *U. behensis* reached to 26.

References

- Bahçecioglu, Z. & Yıldız, B. 2005. A study on the microfungi of Sivas Province. *Turkish Journal of Botany*, 29: 23–44.
- Bahçecioglu, Z., Kabaktepe, S. & Yıldız, B. 2006. Microfungi isolated from plants in Kahramanmaraş Province, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 30: 419–434.
- Bahçecioglu, Z. & Kabaktepe, Ş. 2012. Checklist of rust fungi in Turkey. *Mycotaxon*, 119: 494.
- Cullen, M.J.E. & Coode, J. 1967. *Silene* L. In (Ed.) Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh. Volume 2, 179–242.
- Dudka, I.O., Heluta, V.P., Tykhonenko, Y.Y., Andrianova, T.V., Hayova, V.P., Prydiuk, M.P., Dzhagan, V.V., & Isikov, V.P. 2004. *Fungi of the Crimean Peninsula*. M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine.
- Farr, D.F. & Rossman, A.Y. 2016. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*. ARS, USDA. Retrieved November 11, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>
- Genç, G.E., Kandemir, A. & Genç, İ. 2007. A new species of *Silene* (*Caryophyllaceae*) from east Anatolia, Turkey. *Nordic Journal of Botany*, 25: 58–63.
- Gobelez, M. 1962. La mycoflore de Turquie 1. *Mycopathologia Applicata*. 19(4): 296–314.
- Greuter, W. 1995. *Silene* L. (*Caryophyllaceae*) in Greece: A subgeneric and sectional Classification. *Taxon*, 44: 543–581.
- Henderson, D.M. 1964. Uredinales from S.W. Asia III. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh*. 25: 197–277.
- Kabaktepe, S. & Bahçecioglu, Z. 2006. Microfungi identified from the Flora of Ordu Province in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 30: 251–265.
- Tamer, A.U., Altan, Y. & Gucin, F. 1989. Gulveren koyu (Erzurum Senkaya) florasında belirlenen bazı parazit funguslar. *Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dergisi*, 1(2): 45–55.

ÇANAKKALE (YENİCE) İLİNDE ÜRETİLEN ÇİĞ SÜTLERİN BAZI ÖZELLİKLERİ VE SUBKLİNİK (GİZLİ) MASTİTİS GÖRÜLME ORANI

Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ¹, Nükhet N. ZORBA^{2*}

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yenice Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü, 17550, Yenice-Çanakkale

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü 17020, Merkez-Çanakkale

*Corresponding author: e-mail: dnukhet@hotmail.com, dnukhet@comu.edu.tr

Alınış (Received): 11 Nisan 2017, Kabul (Accepted): 25 Nisan 2017, Erken Görünüm (Online First): 26 Nisan 2017, Basım (Published): 15 Haziran 2017

Özet: Yetiştiricilikte önemli ekonomik kayıplara neden olan subklinik mastitis hastalığı dünyanın ve ülkemizin en önemli sorunu haline gelmiştir. Subklinik mastitis gözle fark edilemediğinden dolayı süt ve süt ürünleri üretimine dahil olmaktadır. Bu çalışmada Çanakkale-Yenice ilçesindeki 134 müstahsilin çiğ süt örneklerinde pH, elektrik iletkenliği, ve donma noktası gibi fiziksel özellikler, su, yağ, protein, laktoz, yağsız kuru madde ve mineral madde oranı gibi kimyasal özellikler ve toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı (TAMB), toplam koliform grubu bakteri sayısı ve *Escherichia coli* varlığı araştırılmıştır. Ayrıca örneklerin somatik hücre sayısı ve California mastitis test (CMT) değeri belirlenerek subklinik mastitis varlığı belirlenmiştir. Subklinik mastitis bulgusu ile diğer özellikler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çiğ sütlerin, ortalama pH, EI ve DN değerleri sırasıyla $6,75 \pm 0,01$, $5,83 \times 10^{-3} S/cm$ ve $-0,5296 \pm 0,002$, olarak, protein, laktoz, mineral madde ve yağ miktarları ise sırasıyla $\%3,37 \pm 0,03$, $\%4,99 \pm 0,03$, $\%0,64 \pm 0,01$ ve $\%3,10 \pm 0,06$ olarak tespit edilmiştir. Ayrıca örneklerin $\%99,2$ 'sinin $5 \log_{10} cfu/mL$ 'den yüksek TAMB içerdiği, $\%13,4$ 'ünde ise *E. coli* bulunduğu belirlenmiştir. Çanakkale, Yenice'de subklinik mastitis olgusu $\%59$ oranında tespit edilmiştir. Subklinik mastitisli sütler (CMT değeri ≥ 2) ile normal sütlerin (CMT değeri < 2) sadece CMT değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,001$). CMT ve SHS değerleri ile EI değerleri ve diğer özellikler arasında güçlü bir korelasyon tespit edilememiştir ($r < \pm 0,500$).

Anahtar kelimeler: California mastitis testi, çiğ süt, somatik hücre sayısı, subklinik mastitis.

Some Properties of Raw Milk Produced in Çanakkale (Yenice) City and The Incidence of Subclinical (Hidden) Mastitis

Abstract: Subclinical mastitis that causes significant economic losses in husbandry has been the most important case in the world and in our country. Since subclinical mastitis is not noticeable, it is involved in milk and dairy products. In this study, physical properties- pH, electrical conductivity, and freezing point-, chemical properties - fat, protein, lactose, fat free dry matter and mineral matter content-, and biological properties - total aerobic mesophilic bacteria (TAMB) and total coliform bacteria counts and *Escherichia coli* incidence of 134 raw milk samples of Çanakkale-Yenice were investigated. In addition, subclinical mastitis incidence was defined by determining the number of somatic cells in the samples and their California mastitis test (CMT) values. The relationship between subclinical mastitis incidence and other milk properties was investigated. The mean pH, EI and DN values of the raw milks sampled were 6.75 ± 0.01 , $5.83 \times 10^{-3} S/cm$ and -0.5296 ± 0.002 , respectively, while protein, lactose, mineral matter and fat contents were $3.37 \pm 0.03\%$, $4.99 \pm 0.03\%$, $0.64 \pm 0.01\%$ and $3.10 \pm 0.06\%$, respectively. 99.2% of the samples were found to contain TAMB higher than $5 \log_{10} cfu/mL$ and 13.4% were found to include *E. coli*. The relationship between subclinical mastitis and these values have been also investigated. The incidence of subclinical mastitis in Çanakkale-Yenice was determined as 59% . Only the difference between CMT values of subclinical mastitis milk (CMT value ≥ 2) and healthy milk (CMT value < 2) was found to be statistically significant ($p < 0.001$). There was no strong correlation between CMT, SHS, and EI values and other milk properties ($r < \pm 0.500$).

Key words: California mastitis test, raw milk, somatic cell count, subclincic mastitis.

Giriş

Dünyada üretilen sütün $\%53$ 'ü modern süt işletmelerinde işlenirken, AB (Avrupa Birliği) ülkelerinde bu oran $\%94$ 'tür. Türkiye'de ise çiğ sütün sanayiye işlenmesi bu oranların oldukça altındadır. Ayrıca süt ve süt ürünlerinde $\%40$ oranında kayıt dışı tüketim olduğu bildirilmiştir (Mola ve ark. 2011). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2015 verilerine göre Türkiye'de

16.933.520 ton, Çanakkale bölgesinde 316.396 ton inek sütü toplanmıştır. Süt üretimi ülke ekonomisi açısından oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Fakat sektörün en önemli sorunu kaliteli çiğ süt azlığı, çiğ süt üretiminde ve son ürünlerdeki verim düşüklüğüdür. Süt sığırcılığının dünyada ve ülkemizde en büyük problemi mastitis hastalığıdır (Alpay ve Yeşilbağ 2009, Diler ve ark. 2013,

Santiago ve ark. 2015, Weiner ve ark. 2015) Mastitis, hayvan meme dokusundaki süt bezlerinde, süt kanal ve boşluklarında meydana gelen hastalıklar olarak adlandırılmakla birlikte çoğunlukla meme bezi yangısı (iltihaplanması) olarak bilinmektedir (Çoban ve Tüzemen 2007, Gürbulak ve ark. 2009). Yetiştiricilikte önemli ekonomik kayıplara neden olmakla birlikte, sütte fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik değişikliklere de neden olmaktadır. Mastitis hastalığı klinik ve subklinik olarak başlıca iki biçimde ortaya çıkmaktadır (Sabuncuoğlu ve Çoban 2006, Santiago ve ark. 2015). Klinik mastitis hastalığı, üretici tarafından gözle fark edilebilmekte ve tedavisinde antibiyotik kullanılmaktadır. Klinik mastitis olgulu memeden elde edilen sütler hem görünüş hem de diğer özellikleri dolayısıyla üretime katılmamaktadır. Subklinik mastitis hastalığı ise, üreticiler tarafından çıplak gözle fark edilememektedir. Bu hastalık süt verim ve kalitesinde kayıplara neden olmakta, fark edilmediğinden üretime normal sütler ile birlikte girmekte ve son üründe ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. (Baştan ve ark. 1997, Çoban ve Tüzemen 2007, Aytekin ve Boztepe 2014, Guerrero ve ark. 2015). Bazı araştırmacılar mastitis hastalığındaki kayıpların ortalama %70-75'nin kaynağının subklinik mastitis olduğunu ifade ederken (Baştan ve ark. 1997, Gürbulak ve ark. 2009) diğerleri ise her bir klinik mastitise karşılık ortalama 45 subklinik mastitis vakası ile karşılaştığını ifade etmişlerdir (Yalçın 2000, Kaya ve ark. 2001, Çoban ve Tüzemen 2007).

Subklinik mastitisin başlıca etmeni patojen mikroorganizmalar olmakla birlikte, barınak koşulları, sağım hijyeni gibi çevre koşulları, cins, yaş, ağırlık ve laktasyon sayısı gibi ineğe ait fizyolojik faktörlerde subklinik mastitisin ortaya çıkmasında önemlidir (Kul ve ark. 2006, Atasever ve Erdem 2008, Alpay ve Yeşilbağ 2009). Yetiştiricilikte en sık rastlanan mastitis etmeni mikroorganizmalar; *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Streptococcus agalactiae* Lehmann & Neuman, *S. dysgalactiae* Diernhofer, *S. uberis* Diernhofer, *Escherichia coli* Escherich, *Klebsiella pneumoniae* Trevisan, *K. oxytoca* Flügge ve *Enterococcus* spp. gelmektedir (Şeker ve Özenç 2010, Cervinkova ve ark. 2013, Özdemir ve Kaymaz 2013, Guerrero ve ark. 2015).

Subklinik mastitis tanısı için mastitisin sütte neden olduğu fizikokimyasal ve biyolojik değişiklikler göz önünde bulundurularak, somatik hücre değeri (SHS), süttün elektrik iletkenliği (Eİ), toplam canlı sayısı (TCS) ve California mastitis test değerleri (CMT) gibi bazı özellikler incelenmiştir (Baştan ve ark. 1997, Kaya ve ark. 2001, Gürbulak ve ark. 2009). Çalışmamızda, Çanakkale Yenice'de bulunan 134 müstahsilin çiğ süt örnekleri, pH, Eİ, ve Donma noktası (DN) gibi fiziksel özellikler; su, yağ, protein, laktoz, yağsız kuru madde (YZKM) ve mineral madde oranı gibi kimyasal özellikler ve toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı (TAMB), toplam koliform grubu bakteri sayısı (TKB) ve *E. coli* varlığı gibi biyolojik özellikleri açısından araştırılmıştır. Ayrıca örneklerin somatik hücre sayısı ve California mastitis test

değeri belirlenerek subklinik mastitis varlığı tespit edilmiştir. Böylece bölgedeki subklinik mastitisli sütlerin işletmelere ne oranda katıldığı belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen fizikokimyasal ve biyolojik değerler arasındaki ilişki incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Çiğ süt örnekleri müstahsillerin sabah sütlerinin toplandığı güğümlerden aseptik şartlarda 200ml steril plastik kaplara alınmıştır. Örneklerde Eİ ve pH ölçümleri Hanna Combo (HI 98129) cihazı, DN ise Funke Gerber-Cryostar (Gerber, Almanya) cihazı, yağ, laktoz, protein, mineral madde, kuru madde ve yağsız kuru madde (YZKM) oranları Funke Gerber-3560 Lactostar (Gerber, Almanya) cihazı, somatik hücre değeri ise (SHS) Somatik Counter (Chemometec SCC 400) cihazı ile ölçülmüştür.

Süt örneklerinin TAMB sayısı, Plate Count Agar (PCA, Merck, Almanya), TKB sayısı ve *E. coli* varlığı MUG içeren Flourocoult Violet Red Bile Agar (Flourocoult VRBA, Merck, Almanya) besiyerlerinde dökme plak yöntemine göre uygun dilüsyonlardan ekim yapıldıktan sonra 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılarak hesaplanmıştır (Maturin ve Peeler 2001, Dağdemir ve Özdemir 2006).

İstatistiksel analizlerde IBM SPSS Statistics 20 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analiz yöntemlerinde kullanılan verilerin normallik dağılımı George ve Mallery (2010)'e göre değerlendirilmiştir. Normal sütler ile subklinik mastitisli sütlerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri arasındaki istatistiksel fark bağımsız örneklem T-testi, Ki-kare ve Mann-Whitney U testleri ile araştırılmıştır. CMT değerlerine göre 4 gruba ayırdığımız çiğ sütlerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri arasındaki fark tek yönlü Anova Testi ile araştırılmıştır. Gruplar Tukey ve Games-Howell testleri ile karşılaştırılmıştır. Özellikler arasındaki ilişki Pearson ve Spearman korelasyon katsayısı ile belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca PCA faktör analizi gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar

Subklinik mastitis hastalığının erken ve pratik teşhisi için birçok araştırmacı tarafından hayvanların fizyolojik özellikleri ve süttün fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Atasever ve Erdem 2008, Gürbulak ve ark. 2009, Kaşıkçı ve ark. 2012, Diler ve ark. 2013, Özdemir ve Kaymaz 2013, Timurkan 2014). Bu çalışmada kullanılan çiğ süt örneklerine ait fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1'den de görüldüğü gibi sütlerin kimyasal ve biyolojik özelliklerine ait değerler geniş bir aralıkta değişmektedir. Çiğ sütlerin, ortalama pH, Eİ ve DN değerleri sırasıyla $6,75 \pm 0,01$, $5,83 \times 10^{-3} S/cm$ ve $-0,5296 \pm 0,002^{\circ}C$, olarak, protein, laktoz, mineral madde ve yağ miktarları ise sırasıyla $\%3,37 \pm 0,03$, $\%4,99 \pm 0,03$, $\%0,64 \pm 0,01$ ve $\%3,10 \pm 0,06$ olarak tespit edilmiştir. YZKM, mineral madde, yağ, ilave su, protein miktarları gibi kimyasal kompozisyon açısından ve TAMB ve SHS gibi biyolojik özellikler açısından kodekse uymayan

örnekler tespit edilmiştir. pH değeri çiğ süt alımlarında kontrol edilen önemli bir gösterge değeridir ve sütün pH değerinin 6,8'in üzerinde olması subklinik mastitis hastalığının veya nötralize edici madde katıldığına bir göstergesi olarak kabul edilir. Eİ sütün birleşimindeki iyon miktarına bağlıdır. Normal sütün Eİ 25°C'de 4×10^{-3} – $5,5 \times 10^{-3}$ S/cm arasında değişmektedir (Metin 2005, Kaşıkçı ve ark. 2012). Subklinik mastitisin süte neden olduğu Na ve Cl iyonu artışı Eİ'ni de yükseltmektedir (Baştan ve ark. 1997). Ayrıca soda katılması, sıcaklığın yükselmesi ve asitliğin artması da Eİ'yi etkilemektedir (Metin 2005, Kaptan ve ark. 2012). Çiğ süte toplam canlı sayısı (TCS, logkob/mL) Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY), Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde 30°C'de mL'deki sayısı ≤ 5 logkob/mL (100.000kob/mL) olarak belirlenmiştir. 134 süt örneğinin 37°C'de hesaplanan TAMB sayısının örneklerin %0,8'inde 5logkob/mL'nin altında %99,2'sinde ise 5logkob/mL'den fazla olduğu bulunmuştur. TAMB sayısı artışının birçok nedeni olmakla birlikte en önemli nedenleri; sağım, taşıma, depolama ve işlem sırasında hijyenin sağlanmamasıdır. TKB sayısından gıda mikrobiyolojisinde sanitasyon indikatörü olarak faydalanılmaktadır. Çiğ süte koliform grubu bakterilerin varlığı yetersiz hijyenik koşulların varlığını göstermektedir (Ünlütürk ve Turantaş 2003). TGKY'de çiğ süt ve ısıl işlem görmüş içme sütleri tebliğinde

herhangi bir sınır değer söz konusu değildir. Ayrıca bu çalışma ile araştırılan sütlerin %13,4 (18/134)'ünde *E. coli* varlığı da belirlenmiştir.

SHS göre "Normal süt" ve "Subklinik mastitisli süt" gruplarının fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerin incelenmesi

Toplanan 134 çiğ süt, SHS'na göre iki grup altında toplanmıştır. SHS ≤ 500.000 adet/mL olanlar "Normal süt", SHS > 500.000 adet/mL olan sütler ise "Subklinik mastitisli süt" olarak gruplandırılmıştır. Normal süt ve subklinik mastitisli sütler arasındaki ölçüm parametrelerinin ortalama değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır ($p > 0,05$). Çalışmamızda CMT skoru yüksek olan örneklerimizde SHS'nın yükseldiği izlenmiş ve SHS'na göre ikiye ayırdığımız grupların CMT değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

CMT değerlerine göre örnek gruplarının fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerin incelenmesi

CMT skorlarına göre 4 gruba ayrılan süt örneklerinin TAMB değerleri ($p=0,024$) SHS değerleri ($p=0,00$), DN'ları ($p=0,02$) ve mineral madde miktarları ($p=0,001$) arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmıştır (Tablo 2). TKB, Eİ, protein, laktoz, yağ pH, ilave edilen su değerleri ve YZKM değerleri arasındaki fark istatistiksel

Tablo 1. Çiğ süt örneklerine ait özellikler ve kabul edilen değerler

	Minimum Değer	Maksimum Değer	Ortalama \pm Standart hata	Referans değerler*
pH	5,73	7,03	6,75 \pm 0,01	6,60-6,80
Eİ (S/cm)	4,38	7,6	5,83 \pm 0,04	<5,6
TAMB (logkob/mL)	4,41	9,14	6,88 \pm 0,07	<5
TKB (logkob/mL)	0	8,4	4,62 \pm 0,14	-
CMT	0	4	2 \pm 0,12	0
SHS (adet/mL)	19.000	2.527.000	521.445 \pm 45.522	< 500.000
DN (°C)	-0,4855	-0,5999	-0,5296 \pm -0,0020	-0,545
%Su	0	6,6	0,58 \pm 0,11	0
%Yağ	1,82	6,81	3,10 \pm 0,06	%2,5- 6,0
%Protein	1,99	4,25	3,37 \pm 0,03	%2,9- 5,0
%Laktoz	3,97	6,18	4,99 \pm 0,03	%3,6- 5,5
%YZKM	6,36	11,35	9,03 \pm 0,07	en az 8,5
%Mineral madde	0,34	0,82	0,64 \pm 0,01	%0,6- 0,9

*Anonim 2000, 2006, 2009 ve Metin 2005

Tablo 2. CMT değerlerine göre çiğ sütlerin bazı özellikleri arasındaki farklar.

CMT Grupları	Ortalama \pm Standart hata			
	TAMB Sayısı (logkob/mL)	SHS (adet/mL)	DN (°C)	Mineral Madde (%)
0	6,76 \pm 0,20 AB*	204.500 \pm 30.416 A	-0,5228 \pm 0,002 A	0,67 \pm 0,13 A
1	7,23 \pm 0,14 B	348.571 \pm 42.729 B	-0,5231 \pm 0,004 AB	0,58 \pm 0,29 B
2	6,97 \pm 0,13 AB	506.938 \pm 63.439 B	-0,5356 \pm 0,004 BC	0,61 \pm 0,18 B
3	6,56 \pm 0,13 A	960.156 \pm 116.938 C	-0,5313 \pm 0,004 AC	0,66 \pm 0,01 AB

*Harflendirme CMT grupları arasında her bir sütün için ayrı yapılmıştır. Satırlar arası fark önemlidir.

Tablo 3. Değişkenlerin faktörlere göre dağılımı.

	Faktör Sayısı				
	1	2	3	4	5
%YZKM	0,994				
%Laktoz	0,993				
%Protein	0,993				
CMT		0,922			
SHS (adet/mL)		0,911			
%Mineral			0,892		
pH			-0,825		
DN (°C)				0,892	
%Su				-0,879	
TAMB (logkob/mL)					0,880
TKB (logkob/mL)					0,785

Yöntem: Principal component analysis, Varimax

olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Fakat bu grupların ortalama değerlerine bakıldığında SHS dışında standart bir azalış veya artıştan bahsetmek mümkün değildir.

Örneklerin Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Özellikler Arasındaki İlişki

Örneklerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri arasındaki ilişki incelenirken Pearson korelasyon katsayısı $\leq 0,500$ olan değişkenlerin arasındaki ilişki zayıf olarak değerlendirilmiştir. TKB sayısı ile TAMB sayısı arasında $r=0,621$ pozitif yönde bir ilişki söz konusudur. Çiğ süt örneklerimizde TKB sayısı arttıkça veya azaldıkça TAMB sayısının da arttığı veya azaldığı anlamına gelmektedir. Yine örneklerimizin % laktoz oranları ile % protein oranları arasında $r=0,865$ pozitif yöne bir ilişki söz konudur. Laktoz seviyesi yüksek olan sütlerimizin protein seviyesi de yüksek bulunmuştur. % laktoz oranı ile TAMB sayısı arasında negatif zayıf yönlü korelasyon ($r=-0,376$), % protein oranı ile yine TAMB sayısı arasında negatif zayıf yönlü korelasyon ($r=-0,389$) ve YZKM ile TAMB sayısı arasında negatif zayıf korelasyon ($r=-0,418$) tespit edilmiştir. TAMB sayısı artan sütlerde subklinik mastitis olgusu var olma olasılığı yüksektir. Mastitis olgusunun laktoz miktarında azalışa neden olduğu fakat toplam protein ve yağ içeriği hakkındaki verilerin çelişkili olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Le Maréchal ve ark. 2011). YZKM oranları ile laktoz oranları arasındaki pozitif yönlü korelasyon katsayısı $r=0,947$ olarak tespit edilmiştir. % laktoz oranı fazla/az olanlarda % protein oranlarının da fazla/az olduğu, % YZKM oranı fazla/az olan örneklerde % laktoz oranında fazla/az olduğu belirlenmiştir. Normal dağılım göstermeyen pH, SHS, DN, yağ ve su değişkenleri arasında Sperman korelasyon katsayıları

hesaplanmıştır. DN ile su oranı arasında $r=-0,856$ olarak bulunmuştur. Buna göre DN değeri azaldıkça % su (ilave edilmiş su) oranı artmakta veya DN değeri arttıkça % su oranı azalmaktadır. Normal sütün DN değeri $-0,540^{\circ}\text{C}$ olarak kabul edilmekte olup süte su katıldığında bu değer azalmakta olduğu ifade edilmiştir (Metin 2005).

Yapılan faktör analizi sonucunda Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) değeri $>0,5$ olarak Barlett's test sonucu ise $p<0,001$ olarak tespit edilmiştir (Olawale ve Garwe 2010). Analiz edilen tüm özellikler 5 faktör altında toplanmıştır. Eİ ve yağ değişkenleri birden fazla faktörde yer aldığı için analizden çıkartılmıştır. Tablo 3'te PCA analizine göre her bir faktör içerisinde yer alan parametreler gösterilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre ileride yapılacak benzer analizlerde aynı faktörde yer alan değişkenlerden bir tanesi hakkında veri toplanmasının subklinik mastitis varlığının belirlenmesinde yeterli olacağını söylenebilir.

Tartışma

Türkiye'nin farklı illerinden alınan toplama tanklarındaki çiğ sütlerdeki subklinik mastitis oranı bölgelere ve işletmelerin hijyen ve sanitasyon konusundaki tutumlarına göre %40 ile %72 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (Kuyucuoğlu ve Uçar 2001, Ergün ve ark. 2004, Tel ve ark. 2009, Ünal ve Yıldırım 2010 Kaşıkçı ve ark. 2012, Özdemir ve Kaymaz 2013). Bu çalışmada ise Çanakale-Yenice'deki toplama tanklarındaki sütlerde subklinik mastitis görülme oranı CMT değerlerine göre %59 bulunmuş, SHS (>500.000 adet/mL)'na göre ise %37,3 olarak tespit edilmiştir. Buna karşın Önal ve Özder (2007) Trakya bölgesindeki sütlerin SHS değerlerini tebliğe uygun bulurken, Patır ve ark. (2010) Türkiye'nin farklı illerinden

topladığı sütlerde subklinik olgusunun %97,5 düzeyinde olduğunu tespit etmiştir.

Subklinik mastitisli sütlerin normal sütlerden zor ayırt ediliyor olması, SHS'nin sahada belirlenmesinin zorluğu, subklinik mastitis tespitinde diğer parametrelerin araştırılmasına neden olmuştur. Sütün fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır. Timurkan (2014), Gürbulak ve ark. (2009) ve Atasever ve Erdem (2008) subklinikli sütlerin Eİ ve CMT değerleri arasında bir ilişki tespit edememiş, Eİ'nin tek başına subklinik mastitisi belirlemede yeterli olmadığını ifade etmiştir. Özdemir ve Kaymaz (2013) CMT değerlerinin Eİ'ne göre daha güvenilir sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Çeşitli araştırmacılar, süt hayvanları kontrol programında meme hastalığını işaret eden CMT testinin SHS'ni dolaylı olarak belirleyen hızlı, uygun maliyetli bir yöntem olduğunu ifade etmişlerdir (Sargeant ve ark. 2001, Dingwell ve ark. 2003, Midleton ve ark. 2004, Bhutto ve ark. 2012). Özdemir ve Kaymaz (2013) CMT ile SHS'nin artışı arasında ve Eİ ile SHS arasında korelasyon bulmuştur. Ayrıca, Kaşıkçı ve ark. (2012) ve Baştan ve ark. (1997)'da CMT, SHS, Eİ arasında istatistiksel olarak önemli ($p < 0,001$) pozitif korelasyon tespit etmişlerdir. Reddy ve ark. (2014) subklinik mastitis teşhisini karşılaştırdığı CMT, SHS ve Eİ yöntemlerinde en yüksek özgüllüğü Eİ'nin en yüksek duyarlılığı ise CMT testinin verdiğini belirlemiştir. Duyarlılığı düşük olsa bile Eİ'nin subklinik mastitis belirlemede kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada ise Eİ ile CMT veya SHS arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki bulunmamıştır.

Kaşıkçı ve ark. (2012) CMT, SHS değerleri ile toplam canlı sayısı arasında, Diler ve ark. (2013) SHS ile toplam mikroorganizma yükü arasında pozitif yönlü korelasyon belirlemişlerdir. Bhutto ve ark. (2012) 240 inek üzerinde yaptıkları çalışmada CMT test skorları ile subklinik mastitis etmeni patojen mikroorganizma izolasyonu arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak önemli bulmuşlardır ($p < 0,001$). Çalışmamızda CMT gruplarının TAMB sayıları arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Malek dos Reis ve ark. (2013) mastitise neden olan patojenlerin protein, laktoz, yağsız katı madde ve toplam katı madde bileşimini etkilerken yağ bileşimini etkilemediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda TAMB sayısı ve TKB sayısı değerleri ile protein, laktoz ve yağsız kuru madde miktarları arasında zayıf ($r < 0,500$) negatif yönlü korelasyon tespit edilmiştir. El Zubeir ve ark. (2005)'da mineral madde miktarı ile subklinik mastitis arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmiştir. Kaşıkçı ve ark. (2012) mineral madde miktarları ile CMT, SHS, TCS, Eİ ve istatistiksel olarak önemli ($p < 0,001$) pozitif korelasyon, Özdemir ve Kaymaz (2013) Eİ ile mineral madde miktarı arasında zayıf ($r = +0,314$) korelasyon saptamıştır. Bu çalışmada ise korelasyon analizi sonucunda Eİ ile % mineral madde miktarı arasında zayıf ($r = 0,314$) korelasyon saptanmıştır.

CMT değerlerine göre 4 gruba ayırdığımız sütlerin DN'ları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli

olduğu belirlenmiştir. Fakat Mitchell ve ark. (1989), Ayaşan ve ark. (2011) SHS'nin, Kaşıkçı ve ark. (2012) CMT skorlarının DN üzerine etkisinin önemsiz olduğunu bildirmişlerdir. Zagorska ve Ciprovica (2013) ise laktoz konsantrasyonunun, sütün DN üzerine etkili olduğu, laktoz oranında meydana gelen değişikliklerin sütün DN'ni etkileyeceğini ifade etmişlerdir. Akdağ ve ark. (2017) CMT skorlarının yüksek olduğu süt grubunda DN değerlerinin subklinik mastitisten kaynaklı olarak düştüğünü bildirmiştir. Bu çalışmada ise subklinik mastitisli ve normal sütlerin laktoz konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Ayrıca DN'sinin CMT skoru 0 olan ve 3 olan grupta daha yakın olduğu bu nedenle bu farklılığın tam olarak bir anlam ifade etmediği belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda sütte SHS'nin artmasıyla sütün yağ, protein, laktoz ve toplam kuru maddesinin önemli derecede azaldığı (Schukken ve ark. 1992, Félix ve ark. 2005, Moroni ve ark. 2006), buna karşın protein/yağ oranının arttığı ve bu değerlerdeki farklılıkların önemli olduğu belirtilmiştir (Park ve ark. 2007, Jamrozik ve Schaeffer 2012).

Le Maréchal ve ark. (2011), SHS yüksek olan sütün kullanılmasının inek peynirinde nem içeriğini arttırdığı ve istenmeyen lezzet gelişimine neden olduğu ve pıhtılaşma özelliklerinde olumsuz etkilere neden olduğunu belirlemişlerdir. Vianna ve ark. (2008) tarafından Cottage peynirinde yapılan çalışmada SHS yüksek olan sütlerden üretilen peynirlerde protein içeriğinin ve peynir veriminin düştüğü, nem içeriğinin ise arttığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, Çanakkale-Yenice ilçesindeki 134 müstahsile ait güğüm çiğ sütleri incelenmiştir. Müstahsil sütlerinin SHS, TAMB sayısı, TKB sayısının oldukça yüksek değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin %59'unda subklinik mastitis olgusu tespit edilmiştir. Bu oran Türkiye'de farklı bölgelerde yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermekle birlikte oldukça yüksek bir orandır. Çalışmamızda subklinik mastitis teşhisinde kullanılabilecek farklı süt değişkenleri incelenmiştir. En ekonomik, uygulaması kolay ve hızlı yöntemin CMT testi olduğu belirlenmiştir. CMT skorlarının SHS ile korelasyonunun diğer parametrelere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sütün diğer özellikleri ile subklinik mastitis arasında güçlü herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Bunun en önemli nedeni örnekleminin müstahsil süt güğümlerinden yapılması olabilir. Subklinik veya klinik mastitis olan meme lobu ile sağlıklı meme loblarındaki sütlerin fiziksel kimyasal ve biyolojik özelliklerinin karşılaştırılması daha sağlıklı sonuç verebilir. Yapılan çalışmalarda sütün subklinik mastitisli olmasının belirlenmesinde birden fazla parametrenin birlikte ele alınması konusunda öneriler mevcuttur. Çalışmamızda PCA analizi sonucunda bu parametreler 5 faktör altında toplanmış, belirlenen benzer değişkenlerden bir tanesinin seçilmesi ile iş yükünün azaltılabileceği ön görülmüştür.

Teşekkür

Bu makale Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ'nin Doktora tezinin bir kısmından düzenlenmiştir.

Kaynaklar

- Alpay, G. & Yeşilbağ, K. 2009. Mastitis olgularında virüslerin rolü. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(1): 39-46.
- Anonim, 2000. Türk Gıda Kodeksi Çiğ süt ve ısıtılmış içme sütleri tebliği. Resmi Gazete, 14 Şubat 2000-Sayı: 23964.
- Anonim, 2006. Türk Gıda Kodeksi Çiğ süt ve ısıtılmış içme sütleri tebliğinde değişiklik yapılması hakkında tebliğ, Sayı 26267, Tebliğ No: 2006/38.
- Anonim, 2009. Türk Gıda Kodeksi Çiğ süt ve ısıtılmış içme sütleri tebliğinde değişiklik yapılması hakkında tebliğ, Sayı 27133, Tebliğ No 2009/14.
- Atasever S. & Erdem H. 2008. Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(2): 131-136.
- Ayaşan, T., Hızlı, H., Yazgan, E., Kara, U. & Gök, K. 2011. Somatik hücre sayısının süt üre nitrojen ile süt kompozisyonuna olan etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17: 659-662.
- Aytekin, İ. & Boztepe, S. 2014. Süt sığırlarında somatik hücre sayısı, önemi ve etki eden faktörler. *Türk Tarım-Gıda Bilim Teknoloji Dergisi*, 2: 112-121.
- Baştan, A., Kaymaz, M., Fındık, M. & Erüenal, N. 1997. İneklerde subklinik mastitislerin elektriksel iletkenlik, somatik hücre sayısı ve california mastitis test ile saptanması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 44: 1-6.
- Bhutto, A.L., Murray, R.D. & Woldehiwet, Z. 2012. California mastitis test scores and indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 92(1): 13-17.
- Cervinkova, D., Vlkova, H., Borodacova, I., Makovcova, J., Babak, V., Lorencova, A. & Jaglic, Z. 2013. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Veterinarni Medicina*, 58(11): 567-575.
- Çoban, Ö. & Tüzemen, N. 2007. Siyah alaca ve esmer ineklerde subklinik mastitis için risk faktörleri. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26(1-2): 27-31.
- Dağdemir, E. & Özdemir, S. 2006. Salamura beyaz peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve seçilen bazı izolatların kültür olarak kullanılabilirliği. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 190s.
- Diler, A., Baran, A. & Erdoğan, A. 2013. Çiğ inek sütlerinde somatik hücre sayısı, süt kompozisyonu ve mastitis etkeni mikroorganizmaların identifikasyonu. 8. Ulusal Zooteknik Bilim Kongresi, 5-7 Eylül 2013, Çanakkale, 73-79.
- Dingwell, R.T., Leslie, K.E., Schukken, Y.H., Sargeant, J.M. & Timms, L.L. 2003. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Canadian Veterinary Journal*, 44: 413-416.
- El Zubeir, E.M.I., El Owni, O.A.O. & Mohamed, G.E. 2005. Correlation of minerals and enzymes in blood serum and milk of healthy and mastitic cows. *Research Journal Agriculture and Biological Sciences*, 1: 45-49.
- Ergün, Y., Aslantaş, Ö., Doğruer, G. & Cantekin, Z. 2004. Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Avrasya Veteriner Bilim Dergisi*, 20(4): 25-28.
- Félix, B. V. F., José, M. A., Soares, N. E., Nonato, O. A., Pereira, O. J., Soares, N. R. B., Garcia, M. J. R. & Werner, T. L. 2005. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no estado de goiás. *Ciencia Rural*, 35 (4): 848-854 (abstract).
- George, D. & Mallery, M. 2010. SPSS for windows step by step: a simple guide and reference, 17.0 update (10th ed.) Boston, 386p.
- Guerrero, A., Dallas, D. C., Contreras, S., Bhandari, A., Cánovas, A., Islas-Trejo, A. & Chee, S. 2015. Peptidomic analysis of healthy and subclinically mastitic bovine milk. *International Dairy Journal*, 46: 46-52.
- Gürbulak, K., Canoğlu, E., Abay, M., Atabay, Ö. & Bekyürek, T. 2009. İneklerde subklinik mastitisin farklı yöntemlerle saptanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(5): 765-770.
- Jamrozik, J. & Schaeffer, L.R. 2012. Test-day somatic cell score, fat-to-protein ratio and milk yield as indicator traits for sub-clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 129(1): 11-19.
- Kaptan, B., Kayışoğlu, S. & Demirci, M. 2012. The relationship between some physico-chemical, microbiological characteristics and electrical conductivity of milk stored at different temperature. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8(2): 13-21.
- Kaşıkcı, G., Çetin, Ö., Bingöl, E.B. & Gündüz, M.C. 2012. Relations between electrical conductivity, somatic cell count, california mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Turkish Journal Veterinary and Animal Science*, 36: 49-55.
- Kaya, A., Uzmay, C., Kaya, İ. & Kesenkaş, H. 2001. İzmir ili Holstein damızlık süt sığırcılığı yetiştirici birliği işletmelerinde mastitisin yaygınlık düzeyi ve etkileyen etmenler üzerine araştırmalar II. Mastitisin yaygınlık düzeyi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 38(1): 63-70.
- Kul, E., Erdem, H. & Atasever, S. 2006. Süt sığırlarında farklı meme özelliklerinin mastitis ve süt somatik hücre sayısı üzerine etkileri. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(3): 350-356.
- Kuyucuoğlu, Y. & Uçar, M. 2001. Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. *Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi*, 1: 19-24.
- Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor E. & Le Loir, Y. 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products-a review. *Dairy Science & Technology*, 91(3): 247-282.
- Malek dos Reis, C.B.M., Barreiro, J.R., Mestieri, L., de Felício Porcionato, M.A. & dos Santos, M.V. 2013. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk

- composition in Gyr Cows. *BMC Veterinary Research*, 9(1): 67-74.
29. Metin, M. 2005. Süt Teknolojisi, Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 439s.
 30. Middleton, J.R., Hardin, D., Steevens, B., Randle R. & Tyler, J.W. 2004. Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224: 419-423.
 31. Mitchell, G.E. 1989. The contribution of lactose, chloride, citrate and lactic acid to the freezing point of milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 44: 61-64.
 32. Mola, A.O., Avcı E., Mert İ., Yılmazbilen A.R. & Yıldız S. 2011. Dünya ve Türkiye Süt Endüstrisi Raporu. ASÜD (Ambalajlı Süt ve Süt Ürünleri Sanayicileri Derneği), Ankara.
 33. Moroni, P., Rossi, C.S., Pisoni, G., Bronzo, V., Castiglioni, B. & Boettcher, P.J. 2006. Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. *Journal of Dairy Science*, 89(3): 998-1003.
 34. Olawale, F. & Garwe, D. 2010. Obstacles to the growth of new SMEs in South Africa: A principal component analysis approach. *African Journal of Business Management*, 4(5): 729-738.
 35. Özdemir, S. & Kaymaz, M. 2013. Küçük aile işletmelerinde yetiştirilen ineklerde subklinik mastitis insidensi ve tanı yöntemlerinin karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 8(1): 71-79.
 36. Önal, A.R. & Özder, M. 2007. Trakya'da özel bir süt işleme tesisi tarafından değerlendirilen çiğ sütlerin somatik hücre sayısı ve bazı bileşenlerinin tespiti. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4(2): 195-199.
 37. Park, Y.K., Koo, H.C., Kim, S.H., Hwang, S.Y. & Jung, W.K. 2007. The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. *Journal of Dairy Science*, 90: 5405-5414.
 38. Patır, B., Can, Ö. P. & Gürses, M. 2010. Farklı illerden toplanan çiğ inek sütlerinde somatik hücre sayıları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 24(2): 87-91.
 39. Reddy, B.S.S., Kumari, K.N., Reddy, Y.R., Reddy, M.V.B. & Reddy, B.S. 2014. Comparison of different diagnostic tests in subclinical mastitis in dairy cattle. *International Journal of Veterinary Science*, 3(4): 224-228.
 40. Sabuncuoğlu, N. & Çoban, Ö. 2006. Mastitis ekonomisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1(1): 1-5.
 41. Santiago, G.S., Lasagno, M.C., Alencar, T.A., Ribeiro, L., Dubenczuk, F.C., Oliva, M.S. & Coelho, S.M. 2015. AmpC-lactamase production in *Enterobacteria* associated with bovine mastitis in Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 9(8): 503-508.
 42. Sargeant, J.M., Leslie, K.E., Shirley, J.E., Pulkrabek B.J. & Lim, G.H. 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 84: 2018-2024.
 43. Schukken, Y.H., Leslie, K.E., Weersink, A. & Martin, S.W. 1992. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program. 1. Impact on somatic cell counts and milk quality. *Journal of Dairy Science*, 75(12): 3352-3358.
 44. Şeker, E. & Özenç, E. 2010. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilkokların antibiyotik dirençlilikleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(2): 107-111.
 45. Tel, O.Y., Keskin, O., Zonturlu, A.K. & Kaya, N.B.A. 2009. Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 23(2): 101-106.
 46. Timurkan, H. 2014. İneklerde California mastitis testi ve sütün elektrik iletkenliğinin karşılaştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 28(3): 135-136.
 47. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2015. Süt ve Süt Ürünleri Üretim Miktarı (Ton). <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=85&locale=tr>. (Erişim: Şubat 2017).
 48. Ünal, N. & Yıldırım, M. 2010. İneklerin süt, meme başı derisi ve burun mukozalarından izole edilen stafilkok türlerinin antibiyotik direnç profilleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16: 389-396.
 49. Ünlütürk, A. & Turantaş, F. 2003. Gıda Mikrobiyolojisi, Meta Basım, İzmir, s16.
 50. Vianna, P.C.B., Mazal, G., Santos, M.V., Bolini, H.M.A. & Gigante, M.L. 2008. Microbial and sensory changes throughout the ripening of prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. *Journal of Dairy Science*, 91: 1743-1750.
 51. Weiner, M., Rózańska, H., Kubajka, M., Szulowski, K., Krajewska M. & Wasiński, B. 2015. Occurrence and characterisation of MRSA and extended-spectrum β -Lactamases producing *Escherichia coli* isolated from mastitic cows' milk. *Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy*, 59(2): 191-195.
 52. Yalçın, C. 2000. Cost of mastitis in Scottish dairy herds with low and high subclinical mastitis problems. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science*, 24: 465-472.
 53. Zagorska, J. & Ciprova, I. 2013. Evaluation of factors affecting freezing point of milk. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 7: 106-111.

3-(2-HİDROKSİETİL)-1-(3-AMİNOPROPİL)-1H-İMİDAZOL-3-İUM BROMİD SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Gühergül ULUÇAM

Trakya Üniversitesi, Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Anabilim Dalı, Edirne
Corresponding author: e-mail: gulergul@trakya.edu.tr

Alınış (Received): 09 Şubat 2017, Kabul (Accepted): 17 Nisan 2017, Erken Görünüm (Online First): 22 Mayıs 2017, Basım (Published): 15 June 2017

Özet: Bir N-heterohalka karben tuzu olarak, 3-(2-hidroksietil)-1-(3-aminopropil)-1H-imidazol-3-ium bromid, 3-(1H-imidazol-1-il)propan-1-amin ile 2-bromoetanol'ün reaksiyonu sonucunda sentezlenmiştir. Tuz, N-heterohalka karbenlerin en kararlı gruplarından biri olan imidazol tuzu olarak da isimlendirilebilir. Ürünün moleküler yapısı FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR, GS-MS, elemental analiz yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Ayrıca, antimikrobiyal, antifungal ve antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Probit analizi yapılarak, HeLa ve HepG2 kanser hücre serileri üzerinde 24 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 155,955µM ve 76,769µM olduğu saptanmıştır. Sentezlenen maddenin sağlıklı fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri üzerinde zararlı bir etkisine rastlanmamıştır. *Escherichia coli* (Migula, 1895) O157:H7, *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940) ATCC 19115 bakterileri ve *Candida albicans* (Berhout, 1923) ATCC 10231 mayası üzerinde ise 32µM'lık konsantrasyonda kayda değer antimikrobiyal ve antifungal aktivitesinin de olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Imidazol, karben, antibakterial aktivite, antifungal aktivite, antikanser aktivite.

Synthesis, Characterization and Biological Activities of 3-(2-Hydroxyethyl)-1-(3-Aminopropyl)-1H-Imidazole-3-Ium Bromide

Abstract: 3-(2-hydroxyethyl)-1-(3-aminopropyl)-1H-imidazole-3-ium bromide as an N-heterocyclic carbene salt was synthesized by the reaction of 3-(1H-imidazole-1-yl)propane-1-amine with 2-bromoethanol. The salt can also be named as imidazole salt which is one of the most stable group of N-heterocyclic carbenes. The molecular structure of the product was elucidated by FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR, GS-MS and elemental analysis. The antimicrobial, antifungal and anticancer activities of the imidazole salt were also examined. The probit analysis revealed that IC₅₀ values on HeLa and HepG2 cell lines were 155.955µM and 76.769µM, respectively, at the end of 24 hours treatment. It also was determined that the product has no harmful effect on healthy mouse embryonic fibroblasts (MEF) cells. Significant antimicrobial and antifungal activities of the salt on *Escherichia coli* (Migula, 1895) O157:H7 and *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940) ATCC 19115 bacteria and the yeast *Candida albicans* (Berhout, 1923) ATCC 10231 were determined at a concentration value of 32µM.

Key words: Imidazole, carbene, antibacterial activity, antifungal activity, anticancer activity.

Giriş

Organik ve tıbbi kimyadaki önemi nedeniyle ilk kez izole edilebildiği 1991 yılından bugüne kadar N-heterohalka karbenler üzerindeki araştırmalar sürmektedir (Arduengo ve ark. 1991, Elser ve ark. 2016, Karatas ve ark. 2016). Söz konusu bu moleküller organik sentezlerde, katalizde ve makro moleküler kimyada belirgin roller oynamaktadırlar (Herrmann ve Köcher 1997). İmidazol türevli N-heterohalka karbenler, anti-tümör (Wang ve ark. 2002), antibakteriyel (Joshi ve ark. 2010), antiallerjik (Shelke ve ark. 2009), antiinflamatuvar (Mohammadi ve ark. 2012) gibi pek çok biyolojik aktivite de göstermektedir (Boussessi ve ark. 2016). Bu yüzden bu moleküller biyokimyada ve tıpta hayati derecede önemlidir (Zheng ve ark. 2016). Aynı zamanda, yüksek σ-donor özelliğe sahip olmaları sebebiyle, organometalik kompleksler için uygun ligand özellikleri sağlamaktadırlar (Cavell ve McGuinness 2004, Danopoulos ve ark. 2007, Liu ve ark. 2007, Hahn ve

Jahnke 2008, Yiğit ve ark. 2016). Bu nedenle imidazol türevli metal komplekslerinin giderek artan önemle çalışılmasına devam edilmektedir (Herrmann ve Köcher 1997, Liu ve ark. 2004, Despagne-Ayoub ve Grubbs 2005, Özdemir ve ark. 2015, Şahin ve ark. 2015).

Bu çalışmada daha önce Mi ve ark. (2006) tarafından sentezlenen bir N-heterohalka karben tuzu olan 3-(2-hidroksietil)-1-(3-aminopropil)-1H-imidazol-3-ium bromid (HAİB) farklı başlangıç maddesi kullanılarak yeniden sentezlenmiştir. HAİB moleküler yapısı FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR, GS-MS ve elemental analiz olarak sayılabilecek spektroskopik teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen bileşiğin bu yapı aydınlatması gerçekleştiikten sonra HAİB molekülünün, ilgili literatürden edinilebilen bilgi kapsamında ilk kez antikanser, antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Cihazlar

HAİB molekülünün ^1H - ve ^{13}C -NMR spektrumları, döteryum oksit (D_2O) çözücüsünde sırasıyla Varian 300MHz ve Varian 75,5MHz'de alınmıştır. FTIR spektrumu ise KBr peletleri hazırlanarak $450\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ aralığında Perkin-Elmer BXII spektrometresi ile ölçülmüştür. Kütle spektrumu, Thermo Finnigan Trace DSQ GC/MS cihazı kullanılarak elektron impakt tekniği ile elde edilmiştir. C, H ve N için element analizi, Perkin-Elmer 2400 CHN elementel analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Biyolojik aktivitelerin belirlenmesinde absorbans ölçümleri için Thermoscientific Multiskan Go multiplate spektrofotometresi kullanılmıştır.

Sentez

Hedeflenen kimyasalın sentezlenmesinde başlangıçta Wang ve ark. (2013) tarafından uygulanan iki farklı yöntem benimsendi. Yöntemler arasındaki temel farklılık, birinde reaksiyonlar oda sıcaklığında uygun çözücü kullanılarak gerçekleştirilirken diğerinde geri akış (reflaks) tekniğinin kullanılmasıdır. Ancak geri akış tekniği içeren yöntem uygulandığında çözücü karışımı olarak 5 hekzan:1 etanol kullanılan ince tabaka kromatografisinde (Thin Layer Chromatography, TLC) fazla sayıda madde oluşumu gözlemlendi. Bu nedenle bu yöntemin uygulanmasına son verildi. Başarılı olunan yöntemde, 10mmol 3-(1H-imidazol-1-il)propan-1-amin, tetrahidrofuran içerisinde çözülerek oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 11mmol 2-bromoetanol ilave edildi. Karışım 15 saat karıştırıldı. Reaksiyonun tamamlanması TLC analizi ile izlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra çözücü uçuruldu. Yağimsı kıvamda açık kahve renkli ürün 1,73g miktarında %69 verimle elde edildi.

Ürün : $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{O}_2$

Hesaplanan % : C 38,41; H 6,45; N 16,80.

Ölçülen % : C 38,33; H 6,47; N 16,71.

^1H NMR (300MHz, D_2O , δ , ppm): 7,80 (s, 1H, NCHN), 7,24 (d, 1H, HC=CH), 6,99 (d, 1H, HC=CH), 3,16 (t, 2H, N-CH₂), 3,12 (t, 2H, N-CH₂), 2,96 (t, 2H, CH₂-OH), 2,86 (t, 2H, CH₂-NH₂), 2,23 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

^{13}C NMR (75,5MHz, D_2O , δ , ppm): 136,10 (NCHN), 123,06 (HC=CH), 122,17 (HC=CH), 59,57 (CH₂-OH), 56,44 (N-CH₂), 52,12 (N-CH₂), 49,50 (NH₂-CH₂), 26,45 (CH₂-CH₂-CH₂).

FTIR (KBr, cm^{-1}): 3400, 3175, 2953, 1628, 1513, 1457, 1400, 1285, 1233, 1109, 1084, 1030, 922, 883, 755, 663, 508.

MS(ESI) (m/z): 169,03 [M+H]⁺

Antikanser Aktivite

Antikanser aktivitesinin belirlenebilmesi için MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)

yöntemi kullanılmıştır. Yöntem kültür ortamında, mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantasyonunu sağlar. Tek tabakalı kültürlerde sitotoksosite ölçümleri veya toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde doğruluğu, hız ve nispi basitliği nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Fotakis ve ark. 2005). Sarı renkli olan MTT, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimi ile bağlanır. Bunun sonucunda suda çözünmeyen mor renkli katı kristaller oluşur. Bu oluşumun absorbansı spektrofotometrede ölçülerek canlı hücrelerin yoğunluğu belirlenir (Mosmann 1983).

İnsan rahim ağzı kanseri (HeLa), karaciğer kanseri (HepG2) ve sağlıklı fare embriyonik fibroblast (MEF) hücre hatları Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC, Manassas, VA, USA) satın alınmıştır. Hücre hatları %5 FBS (Fetal Bovine Serum: Yeni Doğan Sığır Serum) (Life Technologies GIBCO, Grand Island, NY, USA), %1 penisilin streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies GIBCO, Grand Island, NY, USA) ve HAMS F12 (1:1) besiyerinde 37°C de %5 CO₂ içeren inkübatörde kuluçka edilmiştir. Yeterli sayıya ulaşan hücreler 96'lık plakalara yüz binlik (10⁵) eşit hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat aynı koşullarda inkübe edildikten sonra 400µM'dan başlayarak yarı yarıya seyreltmek suretiyle 7 doz uygulanmıştır. Kontrol olarak muamele edilmemiş hücreler kullanılmıştır. Doz etkisi için 24 saat beklendikten sonra MTT %-oran canlılık testi yapılmıştır. Test için 5mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT çözeltisi 20µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiş ve 2-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasındaki kuyucuklardaki solüsyonlar uzaklaştırılmış ve her bir kuyuya 200µL ultra saf dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiş ve 5 dakika karanlıkta beklenmiştir. Sonuçlar 492nm de mikropilaka okuyucuda spektrofotometrik yöntemle okunmuştur.

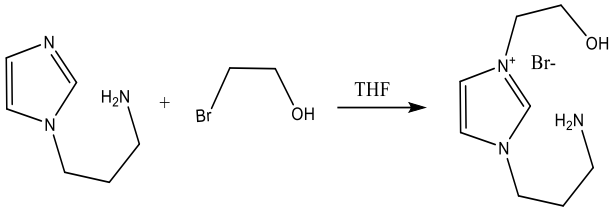
Antibakteriyel ve Antifungal aktiviteler

Çalışmada, Klinik Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) tarafından önerilen Besiyeri Mikro-Seyreltme (Broth Microdilution) yöntemi kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884) ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Salmonella thymurium* (Lignieres, 1900) ATCC 14028, *Bacillus cereus* (Frankland & Frankland, 1887) ATCC 11778 bakterileri ve *Candida albicans* (Berhout, 1923) ATCC 10231 mayası 24 saat 37°C de Tryptic Soy besiyerinde inkübe edilmiş, McFarland Skalası da 0,5'e ayarlanmıştır. Antibiyotik kontrolü olarak bakteri kültüründe Ampisilin ve Gentamisin, maya kültüründe ise Amphoterisin B kullanılmıştır. Sterilite amacıyla antibiyotikler ve çözünen madde stok çözeltileri 0,45µm steril filtreden süzölmüşlerdir. Madde konsantrasyonları 32µM'dan başlayarak yarı yarıya seyreltmek suretiyle altı doz olacak şekilde ayarlanmıştır. 96 lık plakanın her bir kuyusuna besiyerinden 150µL, bakteri ve maya

kültürlerinden 30µL ve HAİB maddesinden 20µL ekilmiştir. Sterilite kontrolü olarak sadece madde eklenmiş, besiyeri büyüme kontrolü olarak sadece mikroorganizma ekilmiş besiyeri kullanılmıştır. Bütün mikropalakalar 24 saat 37°C de inkübe edilmiştir ve 600nm'de absorpsiyon ölçülerek grafikler hazırlanmıştır.

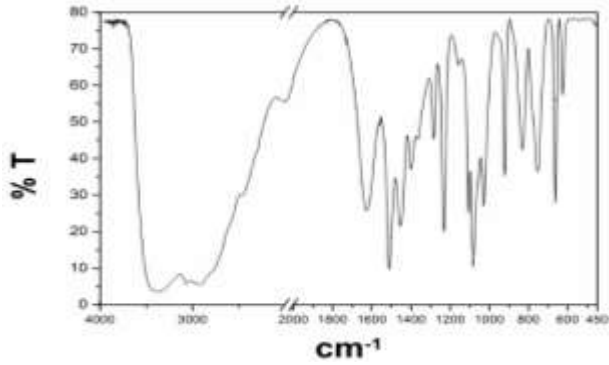
Sonuçlar ve Tartışma

HAİB molekülünün sentezlenmesini açıklayan kimyasal reaksiyon modeli Şekil 1'de gösterilmektedir. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda elde edilen ürün, bir karben halkasına ve alifatik amin grubuna sahip olması nedeniyle asimetric bir geometrik yapıya sahiptir. Bu yapıdan anlaşılacağı üzere molekül, seçilecek uygun reaksiyon koşulları ile karben ucundan metallerle kompleks oluşturabileceği gibi alifatik kollarındaki aktif uçları ile ligand olarak davranabilecek özelliklere de sahiptir.



Şekil 1. HAİB molekülünün sentezlenmesini açıklayan kimyasal reaksiyon (THF: tetrahidrofuran).

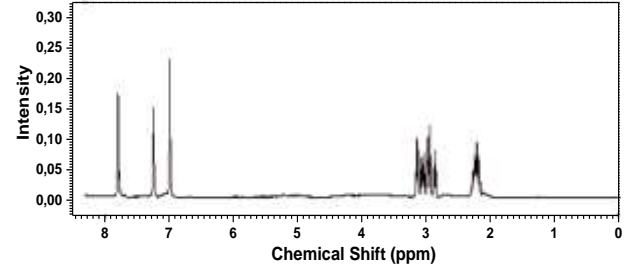
Sentezlenen molekülün yapısal bütünlüğünün doğrulanması için kullanılan ilk yöntem FTIR spektroskopisi olup, ilgili spektrum Şekil 2'de verilmiştir.



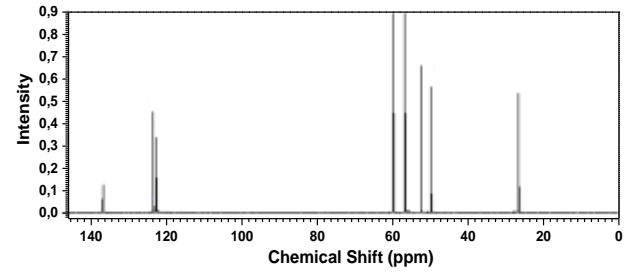
Şekil 2. HAİB molekülünün FTIR spektrumu

Bu FTIR spektrumuna göre OH gerilme titreşimleri moleküller arası etkileşimler ve hidrojen bağları nedeniyle 3500-3000cm⁻¹ aralığında geniş bir bantta gözlenebilmektedir. Bu aralıkta 3175cm⁻¹ de NH gerilmesi ve 2953cm⁻¹ de CH gerilmesi beklentilere uygun olarak ortaya çıkmaktadır (Karabacak ve Kurt 2009, Kose ve ark. 2013). 1640-1560cm⁻¹ aralığında NH düzlem içi eğilmesine ait pik 1628cm⁻¹ ve 900-650cm⁻¹ aralığında, NH düzlem dışı eğilmesine ait pik 755cm⁻¹ gözlenmiştir (Bhat ve ark. 2016). Sırasıyla 1300-1000cm⁻¹ ve 1000-750cm⁻¹ aralığında olması gereken düzlem içi ve düzlem dışı CH salınımları (Bhat ve ark. 2016), deneyde 1233cm⁻¹ ve 922cm⁻¹ gözlenmektedir. Birbirlerine çok

yakın değerlere sahip olan CN titreşim modları imidazol için Ramasamy tarafından 1468, 1440, 1367 ve 1325cm⁻¹ de verilmiştir (Ramasamy 2015). Buna göre deneysel sonuçlarda sırasıyla 1457, 1400, 1375 ve 1285cm⁻¹ de gözlenen titreşim modları, CN modları olarak atanmıştır. FTIR sonuçları beklenen moleküler konfigürasyonu doğrular niteliktedir. Ancak aynı doğrulama NMR yöntemiyle de yapılmıştır.

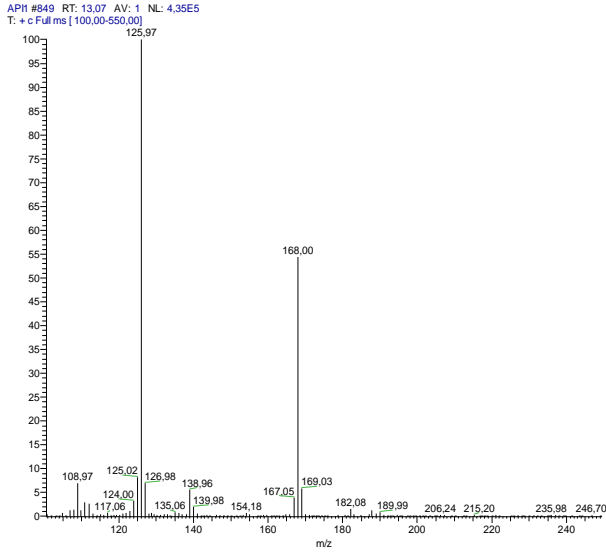


Şekil 3. HAİB molekülünün ¹H NMR spektrumu



Şekil 4. HAİB molekülünün ¹³C NMR spektrumu

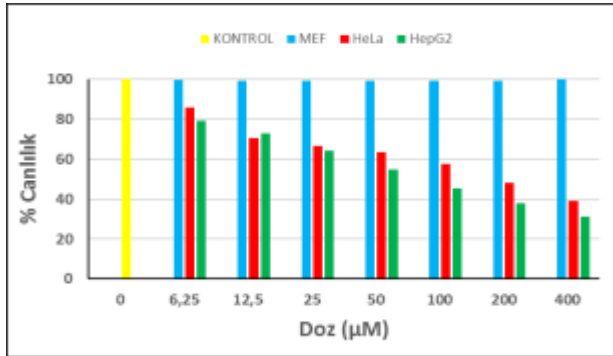
HAİB ¹H ve ¹³C NMR spektrumları Şekil 3 ve Şekil 4'de verilmektedir. ¹H NMR spektrumuna göre 7,80ppm de bir singlet, 7,24ppm ve 6,99ppm de iki adet dublet piki imidazol halkasını göstermektedir. Sırasıyla 3,16ppm, 3,12ppm, 2,96ppm, 2,86ppm'de tripletler ve 2,23ppm'deki multiplet, imidazol kollarındaki alifatik yapıyı desteklemektedir. NMR Spektrumu D₂O çözücüsünde alındığı için OH ve NH₂ ait pikler gözükmemektedir. ¹³C NMR spektrumundaki sekiz adet karbon ön görüldüğü gibi gözlenmektedir. 136,10ppm (NCHN), 123,06ppm (CH=CH), 122,17ppm'de (CH=CH) gözlenen üç karbon imidazol karbonlarını ve 59,57ppm (CH₂-OH), 56,44ppm (N-CH₂), 52,12ppm (N-CH₂), 49,50ppm (NH₂-CH₂), 26,45ppm'deki (CH₂-CH₂-CH₂) beş adet karbon ise alifatik yapıya ait karbonları göstererek HAİB'in varlığını işaret etmektedirler. Bu sonuçlar daha önce aynı molekül için bulunan imidazol halkasına ait protonlarının 7,20-6,98ppm aralığında, alifatik yapıdaki protonlarının 4,15-2,08ppm aralığında, imidazol halkasına ait karbonların 139,2-123,6ppm aralığında, alifatik yapıdaki karbonların ise 62,5-33,9ppm aralığında bulunması ile uyumludur (Mi ve ark. 2005, Mi ve ark. 2006). Ayrıca imidazol halkası NMR verilerinin 1-(Benzofuran-2-il(fenil)metil)-3-butil-2-metil-1H-imidazol-3-ium iyodit molekülünün imidazolü ilgilendiren NMR sonuçları Wang ve ark. ile de aynıdır (Wang ve ark. 2013). Elemental analiz sonuçları ve Şekil 5'de gösterilen kütle spektrumu da HAİB'in sentezlendiğini desteklemektedir.



Şekil 5. HAİB molekülünün kütle spektrumu

Antikanser Aktivite

Sentezlenen tuzun sitotoksik etkileri HeLa insan rahim ağzı kanseri, HepG2 insan hepatoma kanseri ve sağlıklı MEF hücre serilerinde denenmiştir. Yapılan denemede 96 kuyucuklu plaklara yöntem kısmında belirtilen şekilde ekilen hücelere, HAİB maddesi 6,25-400 μ M doz aralıklarında 7 farklı konsantrasyonda ve 6 tekrarlı uygulanmıştır. Uygulamada kullanılan HeLa, HepG2 ve MEF hücre serileri karbondioksitli inkübatörde kültüre alınmış ve HAİB'in HeLa, HepG2 ve MEF hücre serilerinde 24 saat süresince hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiştir.



Şekil 6. MEF, HeLa, HepG2 hücre serisinde 24 saat süreyle 6,25-400 μ M doz aralıklarında HAİB uygulamasının hücre canlılığına etkisi. Sarı renk gösterilen kontrol çubuğu her üç hücre için de muamele edilmemiş hücreleri temsil etmektedir.

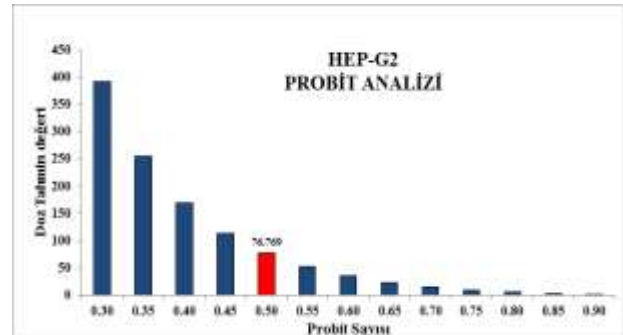
HeLa ve HepG2 hücre serilerinde farklı konsantrasyonlar ile uygulanan HAİB 24 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürmüştür ($p < 0,0001$). Sağlıklı MEF hücreleri üzerinde herhangi bir etkiye rastlanmamıştır (Şekil 6). HeLa ile yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 6,25 μ M uygulama konsantrasyonunda %86,02 \pm 0,07 olarak belirlenirken, HepG2 için aynı oran %79,00 \pm 0,03

olarak belirlenmiştir. 400 μ M HAİB konsantrasyon ortamdaki HeLa hücrelerin sadece %38,83 \pm 0,77'si, HepG2 hücrelerinin ise sadece %31,03 \pm 0,05'si canlı kalmıştır.

Çalışma kapsamında 24 saatlik HAİB uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlenmiştir. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapılmış ve HAİB'nin 24 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değerlerinin 400 μ M üst sınır dozu seçimin altında kalarak HeLa hücre serisi üzerinde 155,955 μ M (Şekil 7), HepG2 hücresi üzerinde ise, 76,769 μ M olduğu saptanmıştır (Şekil 8).



Şekil 7. HeLa hücre serisinde 24 saatlik HAİB uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri. IC₅₀ değerinin gözlenebilmesi için Probit sayıları ve karşılık gelen doz tahmin değerlerinin tümü şekle yansıtılmamıştır.



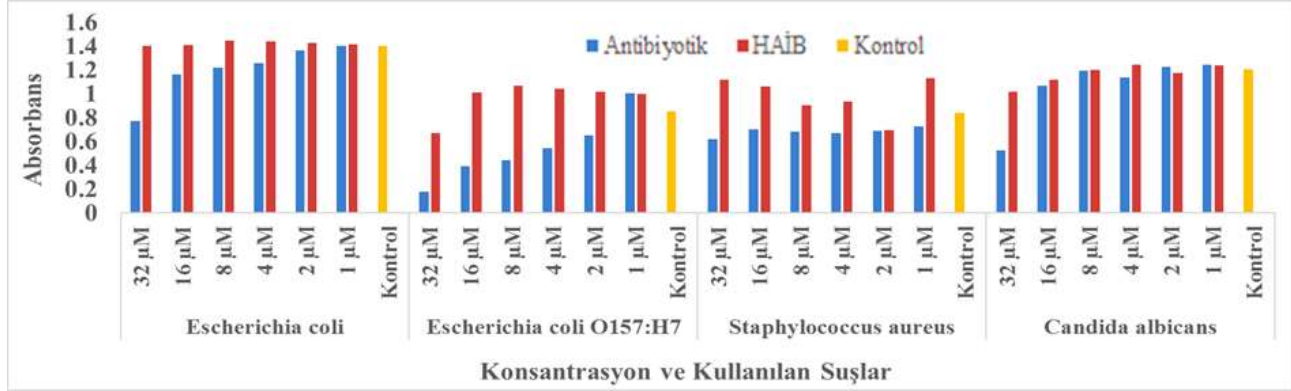
Şekil 8. HepG2 hücre serisinde 24 saatlik HAİB uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri. IC₅₀ değerinin gözlenebilmesi için Probit sayıları ve karşılık gelen doz tahmin değerlerinin tümü şekle yansıtılmamıştır.

IC₅₀ değerleri üzerinden yapılan gözlemlere göre HAİB'in HepG2 üzerinde HeLa'ya kıyasla iki kat etkili olmasına rağmen bu değerler diğer imidazol tuzlarının bu çalışmada kullanılan kanser hücrelerinden farklı kanser hücreleri üzerinde gösterdiği ve IC₅₀ değerlerinin 1 μ M-20 μ M aralığında olduğu dozlara göre (Wang ve ark. 2013) oldukça yüksektir. Ancak, diğer sağlıklı hücreler için bir genelleme yapılamamakla birlikte HAİB'in sağlıklı MEF hücreleri üzerinde herhangi zararlı bir etkisinin gözlenmemesi de olumlu bir sonuç oluşturmaktadır.

Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite

HAİB'in antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 μM 'lık konsantrasyonlarda altı bakteri ve bir maya üzerinde araştırılmıştır. Bakterilerde ampisilin ve gentamisin, maya da ise amphotericin-b antibiyotikleri aynı konsantrasyonlarda kontrol olarak kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara ekilen bakteri ve maya üzerine HAİB ve antibiyotik konsantrasyonları ayrı ayrı ilave edilmiş ve 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elisa plaka okuyucuda 600nm dalga boyunda okumaları yapılarak absorbans değerleri ölçülmüştür.

Aktivite testlerinin uygulandığı altı bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella thymurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 iken, antifungal aktivite *Candida albicans* ATCC 10231 mayası üzerinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların bazıları antibiyotik kontrolleri ile birlikte Şekil 9'da gösterilmiştir. *S. aureus*, *B. cereus* ve *L. monocytogenes* üzerindeki sonuçlar absorbans ölçümlerindeki istatistik olarak hatalı sonuçlar nedeniyle verilmemiştir.



Şekil 9. HAİB tuzunun üç bakteri ve bir maya üzerindeki antimikrobiyal aktivite grafiği (Değerler % canlılık olarak hesaplanarak grafiğe aktarılmıştır).

HAİB'in *E. coli* ATCC 25922 ve *S. thymurium* ATCC 14028, bakterilerinde hiçbir etkisi görülmez iken *E. coli* O157:H7 ve *C. albicans* ATCC 10231 mayası üzerinde 32 μM doz için orta dereceli aktivite gösterdiği söylenebilir. Ancak antibiyotiklere kıyasla bu etkiler 32 μM 'dan daha yüksek dozların denenmesine gerek olmadığını açıklığa kavuşturmuştur.

Bir N-heterohalka karben tuzu olarak sentezlenen molekülü elemental analiz ve kütle spektrometresi ile doğrulandığı gibi aynı zamanda NMR ve FTIR spektrumları ile de kontrol edilmiştir. NMR spektrumları molekülün karben halka yapısını ve alifatik uzantılarını

doğrulamakla birlikte döteryum oksit çözücüsü kullanarak ölçüldüğü için OH ve NH uzantılarını vermemiştir. Bu eksiklik beklenen frekanslarında elde edilen NH ve OH modlarının FTIR spektrumunda gözlenmesi ile giderilmiş ve molekülün sentezi tam anlamıyla doğrulanmıştır. Molekülün antikanser, antibakteriyel ve antifungal etkileri istatistik olarak anlamlıdır ve sağlıklı hücre üzerinde zararlı etki gözlenmemesi uygulama potansiyelinin olabileceği anlamını taşımaktadır. Ayrıca, çeşitli varyasyonlarda metallerle kompleks yapabilme özellikleri sentezlenen ürüne ligand olarak da önem kazandırmaktadır.

Kaynaklar

1. Arduengo, A.J., Harlow, R.L. & Kline, M. 1991. A stable crystalline carbene. *Journal of the American Chemical Society*, 113 (1): 361-363.
2. Bhat, S.A., Faizan, M., Alam, M.J. & Ahmad, S. 2016. Vibrational and electronic spectral analysis of 2,3-pyrazinedicarboxylic acid: A combined experimental and theoretical study. *Spectroscopy Letters*, 49 (7): 449-457.
3. Boussessi, R., Dalbouha, S., Timón, V., Komiha, N., Jaïdane, N. & Senent, M.L. 2016. Stability of Van der Waals complexes of the greenhouse effect gases CH₄ and SF₆ with imidazole in gas mixtures containing CO₂. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1094: 82-91.
4. Cavell, K.J. & McGuinness, D.S. 2004. Redox processes involving hydrocarbylmetal (N-heterocyclic carbene) complexes and associated imidazolium salts: ramifications for catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, 248 (7-8): 671-681.
5. Danopoulos, A.A., Tsoureas, N., Macgregor, S.A. & Smith, C. 2007. Phosphine- and Pyridine-Functionalized N-Heterocyclic Carbene Methyl and Allyl Complexes of Palladium. Unexpected Regiospecificity of the Protonation Reaction of the Dimethyl Complexes. *Organometallics*, 26 (2): 253-263.
6. Despagne-Ayoub, E. & Grubbs, R.H. 2005. A Ruthenium Olefin Metathesis Catalyst with a Four-Membered N-Heterocyclic Carbene Ligand. *Organometallics*, 24 (3): 338-340.
7. Elser, I., Frey, W., Wurst, K. & Buchmeiser, M.R. 2016. Molybdenum Imido Alkylidene Complexes Containing N- and C-Chelating N-Heterocyclic Carbenes. *Organometallics*, 35 (24): 4106-4111.
8. Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D. & Timbrell, J.A. 2005. Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal

- damage in a hepatoma cell line. *Toxicology in Vitro*, 19 (4): 481-489.
- Hahn, F.E. & Jahnke, M.C. 2008. Heterocyclic carbenes: synthesis and coordination chemistry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 47 (17): 3122-3172.
 - Herrmann, W.A. & Köcher, C. 1997. N-Heterocyclic Carbenes. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 36 (20): 2162-2187.
 - Joshi, R.S., Mandhane, P.G., Shaikh, M.U., Kale, R.P. & Gill, C.H. 2010. Potassium dihydrogen phosphate catalyzed one-pot synthesis of 2,4,5-triaryl-1H-imidazoles. *Chinese Chemical Letters*, 21 (4): 429-432.
 - Karabacak, M. & Kurt, M. 2009. The spectroscopic (FT-IR and FT-Raman) and theoretical studies of 5-bromo-salicylic acid. *Journal of Molecular Structure*, 919 (1-3): 215-222.
 - Karatas, M.O., Olgundeniz, B., Gunal, S., Ozdemir, I., Alici, B. & Cetinkaya, E. 2016. Synthesis, characterization and antimicrobial activities of novel silver(I) complexes with coumarin substituted N-heterocyclic carbene ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24 (4): 643-650.
 - Kose, E., Atac, A., Karabacak, M., Nagabalasubramanian, P.B., Asiri, A.M. & Periandy, S. 2013. FT-IR and FT-Raman, NMR and UV spectroscopic investigation and hybrid computational (HF and DFT) analysis on the molecular structure of mesitylene. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 116: 622-634.
 - Liu, Q.-X., Xu, F.-B., Li, Q.-S., Song, H.-B. & Zhang, Z.-Z. 2004. Formation of the Fluorescent Complexes [(carbene)2MII(CN)2] (M = Ni, Pd, Pt) by C-C Bond Cleavage of CH3CN. *Organometallics*, 23 (3): 610-614.
 - Liu, Q.-X., Zhao, X.-J., Wu, X.-M., Guo, J.-H. & Wang, X.-G. 2007. New mercury(II) and silver(I) complexes containing NHC metallacrown ethers with the π - π stacking interactions. *Journal of Organometallic Chemistry*, 692 (25): 5671-5679.
 - Mi, X., Luo, S. & Cheng, J.P. 2005. Ionic liquid-immobilized quinuclidine-catalyzed Morita-Baylis-Hillman reactions. *The Journal of Organic Chemistry*, 70 (6): 2338-2341.
 - Mi, X., Luo, S., Xu, H., Zhang, L. & Cheng, J.-P. 2006. Hydroxyl ionic liquid (HIL)-immobilized quinuclidine for Baylis-Hillman catalysis: synergistic effect of ionic liquids as organocatalyst supports. *Tetrahedron*, 62 (11): 2537-2544.
 - Mohammadi, A.L.I., Keshvari, H., Sandaroods, R., Rouhi, H. & Sepehr, Z. 2012. A novel polymeric catalyst for the one-pot synthesis of 2,4,5-triaryl-1H-imidazoles. *Journal of Chemical Sciences*, 124 (3): 717-722.
 - Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2): 55-63.
 - Özdemir, İ., Düşünceli, S.D., Kaloğlu, N., Achard, M. & Bruneau, C. 2015. Synthesis of ruthenium N-heterocyclic carbene complexes and their catalytic activity for β -alkylation of tertiary cyclic amines. *Journal of Organometallic Chemistry*, 799-800: 311-315.
 - Ramasamy, R. 2015. Vibrational spectroscopic studies of imidazole. *Armenian Journal of Physics*, 8 (1): 51-55.
 - Shelke, K.F., Sapkal, S.B., Shitole, N.V., Shingate, B.B. & Shingare, M.S. 2009. Microwave-Assisted Synthesis of 3-Styrylchromones in Alkaline Ionic Liquid. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 30 (12): 2883-2886.
 - Şahin, Z., Gürbüz, N., Özdemir, İ., Şahin, O., Büyükgüngör, O., Achard, M. & Bruneau, C. 2015. N-Alkylation and N,C-Dialkylation of Amines with Alcohols in the Presence of Ruthenium Catalysts with Chelating N-Heterocyclic Carbene Ligands. *Organometallics*, 34 (11): 2296-2304.
 - Wang, L., Woods, K.W., Li, Q., Barr, K.J., McCroskey, R.W., Hannick, S.M., Gherke, L., Credo, R.B., Hui, Y.H., Marsh, K., Warner, R., Lee, J.Y., Zielinski-Mozng, N., Frost, D., Rosenberg, S.H. & Sham, H.L. 2002. Potent, orally active heterocycle-based combretastatin A-4 analogues: synthesis, structure-activity relationship, pharmacokinetics, and in vivo antitumor activity evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (8): 1697-1711.
 - Wang, X.Q., Liu, L.X., Li, Y., Sun, C.J., Chen, W., Li, L., Zhang, H.B. & Yang, X.D. 2013. Design, synthesis and biological evaluation of novel hybrid compounds of imidazole scaffold-based 2-benzylbenzofuran as potent anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62: 111-121.
 - Yiğit, B., Yiğit, M., Dağdeviren, Z. & Özdemir, İ. 2016. Synthesis of silver(I) and palladium(II) N-heterocyclic carbene complexes and their use as catalysts for the direct C5 arylation of heteroaromatic compounds. *Transition Metal Chemistry*, 41 (7): 751-757.
 - Zheng, G.-C., Cai, Z.-B., Pan, Y.-L., Bai, L., Zhou, Y.-T., Li, S.-L. & Tian, Y.-P. 2016. Synthesis and two-photon absorption properties of novel 2-substituted-4,5-diphenyl-1H-imidazoles. *Tetrahedron*, 72 (22): 2988-2996.

DEVAM SÜTLERİNDE AFLATOKSİN M1 VARLIĞININ ELISA YÖNTEMİYLE TESPİT EDİLMESİ

Meltem KAYA TUZ¹, Ahmet ASAN^{2*}, Suzan ÖKTEN³

¹Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji AD. Edirne

²Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji AD. Edirne

³Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji AD. Edirne

*Corresponding author: e-mail: ahmetasan84@gmail.com

Alınış (Received): 24 Şubat 2017, Kabul (Accepted): 28 Mart 2017, Erken Görünüm (Online First): 24 Mayıs 2017, Basım (Published): 15 Haziran 2017

Özet: Önemli bir besin kaynağı olan süt, bebek beslenmesinde kullanılmakta ve tüm dünyada tüketilmektedir. Devam sütlerine geçtiği bilinen kimyasal kontaminantlardan biri mikotoksinlerdir. Küfler tarafından üretilen ve devam sütlerine geçebilen mikotoksinler bebekte sağlık riski oluşturabilir. Mikotoksinlerin toksik etkilerinin önlenmesi için bebeğin normal büyüme ve gelişimi için en önemli besinlerden biri olan devam sütündeki aflatoksin M1 düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Süt kontaminantı olarak aflatoksinlerin kontrolü ile ilgili sosyal koruma projelerinin ve devam sütleri ile ilgili farkındalığın artırılması halk sağlığı korunması açısından önem arz eder. Çalışmamızda, yeni doğanların diyetlerinde aldığı ürün olan devam sütlerinde, aflatoksin M1'in varlığı ve halk sağlığı bakımından önemi araştırılmıştır. Bu amaçla, 7 farklı firmadan, farklı seri numaralarına sahip süt örneklerini içeren 60 adet devam sütü toplanmıştır. Çalışmamızda Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak devam sütlerinde aflatoksin M1 miktarları araştırılmıştır. Avrupa Birliğine uyum çerçevesinde hazırlanmış olan 2008/26 sayılı gıda maddelerindeki kontaminasyonların maksimum limitleri hakkındaki Türk Gıda Kodeksi (TGK) Tebliğinde; çiğ süt, UHT süt ve süt içeren ürünlerin yapımında kullanılan sütlerde maksimum AFM1 miktarının 0.05 µg/kg (parts per billion) olması gerektiği belirtilmiştir. Aflatoksin M1 konsantrasyonları hesaplandığında; <0.05 parts per billion konsantrasyon aralığında Aflatoksin M1 içeren 37 örnek, >0.05 ppb konsantrasyon aralığında Aflatoksin M1 içeren 23 örnek tespit edilmiştir. Sonuç olarak Türk Gıda Kodeksi limit değerini aşan 23 örnek halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Beslenmede devam sütünün sıklıkta tüketildiği ve önemli bir rol oynadığı bebek yaş grubunda, bu ürünler piyasaya çıkmadan önce Aflatoksin M1 varlığının saptandığı daha kapsamlı araştırmaların yapılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Devam sütü, aflatoxin M1, Elisa yöntemi.

Determination of Aflatoxin M1 on Follow-on Milk by ELISA Method

Abstract: Milk, which is an important source of nutrition is used for infant feeding and consumed widely all over the world. Mycotoxins are one of the chemical contaminants that are known to pass through milk. They are produced by molds and pass through milk, and may cause health problems in infants. Determination of aflatoxin M1 levels in follow-on milks which is one of the most important nutrients for healthy grown babies is important in prevention of toxic effects of mycotoxins. Promoting social protection studies concerning aflatoxins as milk contaminants and raising awareness on follow-on milks is important in protection of public health. In our study, investigation of aflatoxin M1 in follow-on milks; a product that newborns take in their diet, and to evaluate the results in terms of public health. For this purpose, 60 follow-on milk samples with different serial numbers were collected from 7 companies. In Turkish Food Codex Communiqué related to the contaminations in food products with in accordance with the law no 2008/6 for preparation compliance as part of European Union, indicated that the raw milk, UHT milk and other milks used for production of some products containing milk, maximum aflatoxin M1 should be 0.05 µg/kg (parts per billion). Aflatoxin M1 concentrations were determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Our results showed that 37 samples contained aflatoxin M1 with <0.05 parts per billion concentrations, while 23 samples contained aflatoxin M1 with >0.05 parts per billion concentrations. In conclusion, the latter 23 samples including aflatoxin M1 values above Turkish Food Codex limits are important in terms of public health.

Key words: Follow-on milk, aflatoxin M1, Elisa method.

Giriş

Gelişimin erken döneminde sadece inek sütündeki vitamin ve mineraller, bebeklerin besin ihtiyacını karşılamada yetersiz kalabilir. Devam sütleri; inek sütünün faydaları ile biberon mamalarının sunduğu

besinleri birleştirir. Ancak devam sütlerine geçebilen bazı maddeler bebek sağlığını tehdit etmektedir. Örneğin, bunlardan biri de mikotoksinlerdir (Mead 2010). *Aspergillus flavus* Link, *A. parasiticus* Speare ve *A.*

oryzae (Ahlb.) Cohn gibi küfler tarafından oluşturulurlar. Bu küfler doğada yaygın olarak bulunurlar (Asan 2004) ve özellikle nem ve sıcaklığın uygun olduğu koşullarda depolanan ürünlerde kolayca gelişebilirler (Sümer 2006). Bebek ve çocukların biyotransformasyon kapasitelerinin yetişkinlere göre daha düşük olması ve aflatoksin M1'e (AFM1) yetişkin insanlara göre daha duyarlı olması da yine bu toksinin sağlık açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Süt ve süt ürünlerindeki aflatoksin miktarları coğrafi bölgelere, ülkelere ve mevsimlere göre farklılıklar gösterdiği, bahar ve yaz mevsiminde kış mevsimine oranla daha az miktarlarda AFM1 bulunduğu, dolayısıyla bu mevsimlerde yapılan süt ürünlerinde de AFM1 miktarının önemsenmeyecek düzeylerde görülebileceği bildirilmiştir (Kamkar 2005, Birdane ve ark. 2006, Gommez-Arranz ve Navarro-Blasco 2010). Bu araştırmanın amacı; aflatoksin M1'in devam sütündeki miktarlarını belirleyerek, bebeklerin maruz kalacağı riskleri ve olası sağlık etkilerini yorumlamak, bu riskleri ortadan kaldırmaya yönelik gerekli önlemlerin alınması için önerilerde bulunmaktır.

Materyal ve Metot

Çalışmada 7 farklı firmaya ait devam sütü örnekleri, Eylül 2014 – Şubat 2015 tarihleri arasında toplanmıştır ve numaralandırılmıştır. Toplanan örneklerden seri numarası farklı olan örnekler analize alınmıştır. Örneklerin deney aşamaları Şubat 2015 – Haziran 2015 tarihleri arasında tamamlanmıştır. Süt örnekleri buzdolabı sıcaklığında soğutulup 2-8°C'de 3000×g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi ile süttten yağ tabakası ayrılıp yağsız kısım direkt olarak analize alınmıştır. 25-1250ppt ölçüm aralığında en etkili aflatoksin

M₁ konsantrasyonunu elde etmek için örnek 5 kez dilüe edilmiştir (100µl örnek + 400µl örnek dilüenti).

AFM₁ Varlığının Gösterilmesi: Enzim Immunoassay Prosedürü

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodu ve M1 ELISA test kiti kullanılmıştır. Örneklerin ekstraksiyonundan sonra analiz prosedürü, üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

ELISA Yöntemi ile Aflatoksin M1 Analizi

Aflatoksin M1 ELISA analizi için R-Biofarm RIDASCREEN test kitleri kullanılmıştır.

Sonuçlar RIDA®SOFT Win (Art.No.Z9999) Software ile değerlendirilmiştir. Hesaplamalar aşağıda verilen formülle yapılmıştır.

$$\text{Hesaplama} = \frac{\text{Örneğin absorbanansı} \times 100}{\text{Maksimum bağlanma}}$$

Sonuçlar

2008/26 sayılı gıda maddelerindeki kontaminasyonların maksimum düzeyleri hakkındaki Türk Gıda Kodeksi (TGK) Tebliğinde; çiğ süt, UHT süt ve süt kökenli maddelerin üretiminde kullanılan sütlerde maksimum AFM₁ miktarının 0.05µg/kg (ppb) olması gerektiği bildirilmiştir. Çalışmamızda piyasadan sağlanan yedi farklı firmaya (A, B, C, D, E, F, G) ait 60 adet devam sütü materyal olarak kullanılmıştır. Toplanan örneklerin ELISA testi ile AFM₁ konsantrasyonları hesaplandığında; <0.05 ppb (parts per billion = milyarda 1) konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 37 örnek, >0.05 ppb konsantrasyon aralığında AFM₁ içeren 23 örnek tespit edilmiştir (Tablo 1).

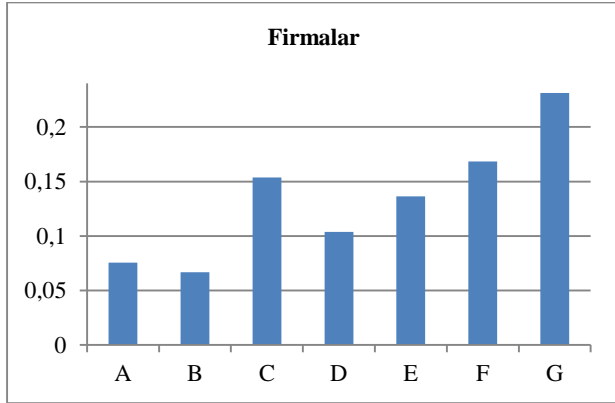
Tablo 1. AFM₁ varlığı pozitif olarak tespit edilen numunelerde AFM₁ konsantrasyonu.

Örnek Numarası	Ortalama Absorbans	Hesaplanan ppt (parts per trillion)	ppb
3	1.580	6.65	0.0665
10	1.550	8.45	0.0845
11	1.573	7.1	0.0710
20	1.587	6.25	0.0625
26	1.471	13.1	0.1310
28	1.394	17.65	0.1765
36	1.475	12.8	0.1280
38	1.582	6.6	0.0660
41	1.493	11.75	0.1175
44	1.176	23.12	0.2312
45	1.487	11.31	0.1131
46	1.535	9.97	0.0997
47	1.208	20.49	0.2049
49	1.505	10.83	0.1083
50	1.359	14.63	0.1463
51	1.236	18.94	0.1894
59	1.486	11.33	0.1133
60	1.101	34.19	0.3419
61	1.439	12.53	0.1253
62	1.224	19.55	0.1955
63	1.432	12.70	0.1270
72	1.312	16.03	0.1603
73	1.519	10.45	0.1045

Tablo 2. Firmalara ait devam sütü örneklerinin AFM1 konsantrasyonları

Örnek No	Firmalar						
	A	B	C	D	E	F	G
1	<0.05	0.0710	<0.05	<0.05	0.1131	<0.05	<0.05
2	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.0997	0.1083	<0.05
3	0.0665	<0.05	<0.05	<0.05	0.2049	0.1463	0.2312
4	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.1894	
5	<0.05	<0.05	<0.05	0.1280	0.1603	<0.05	
6	<0.05	<0.05	0.1310	<0.05	0.1045	0.1133	
7	<0.05	<0.05	<0.05	0.0660	<0.05	0.3419	
8	<0.05	<0.05	0.1765	<0.05		0.1253	
9	<0.05	0.0625	<0.05	<0.05		0.1955	
10	0.0845	<0.05	<0.05	0.1175		0.1270	

AFM1 varlığı tespit edilen 23 devam sütü örneğinden; 0.06-0.07ppb konsantrasyon aralığında AFM1 içeren 3 örnek, 0.07-0.08ppb konsantrasyon aralığında AFM1 içeren 1 örnek, 0.08-0.09 ppb aralığında 1 örnek, 0.09-0.10 ppb aralığında 1 örnek, 0.10-0.11ppb aralığında 2 örnek, 0.11-0.12ppb aralığında 3 örnek, 0.12-0.13 ppb aralığında 3 örnek, 0.13-0.14ppb aralığında 1 örnek, 0.14-0.16 ppb aralığında 1 örnek, 0.16-0.17 ppb aralığında 1 örnek, 0.17-0.18ppb aralığında 1 örnek, 0.18-0.19ppb aralığında 1 örnek, 0.19-0.20ppb aralığında 1 örnek, 0.20-0.23ppb aralığında 1 örnek ve 0.23-0.34 ppb aralığında 1 örnek olduğu görülmüştür (Tablo 1).

**Şekil 1.** Süt örneklerinde saptanan aflatoksin M1 miktarlarının firmalara göre dağılımı, çubuk modeli.

Tablo 2’de firmalara ait tespit edilen AFM1 değerleri, Şekil 1’de de firmalara (A, B, C, D, E, F, G) ait ortalama değerler çubuk grafiği şeklinde gösterilmiştir. Tablo 2 incelendiğinde A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait en düşük ve en yüksek değerler bakımından AFM1 değerleri sırasıyla (ppb) 0.0625, 0.0660, 0.0665, 0.0710, 0.0843, 0.1175, 0.1280, 0.1313 ve 0.1765 sınırları içerisinde olduğu görülmüştür. A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait en düşük ve en yüksek değerler bakımından AFM1 değerleri sırasıyla (ppb) 0.0997, 0.1045, 0.1083, 0.1131, 0.1133, 0.1253, 0.1270, 0.1463, 0.1603, 0.1894, 0.1955, 0.2049, 0.2312 ve 0.3419 olarak bulunmuştur. A, B, C, D, E, F, G firmalarına ait ortalama değerler küçük değerden büyük değere göre sırasıyla A firması % 7, B firması % 8, D

firması % 11, E firması % 15, C firması % 16, F firması % 18 ve G firması % 25 olarak belirlenmiştir. Süt örneklerine ait Aflatoksin M1 (AFM1) bulguları için yapılan varyans analizi sonucuna göre ($p < 0.001$) firmalar arası fark önemli bulunmuştur.

Tartışma

Kuvvetli toksijenik özellik gösteren aflatoksin M1’in devam sütündeki miktarlarını belirlemek, bebeklerin maruz kalacağı riskleri ve olası sağlık etkilerini yorumlamak, bu riskleri ortadan kaldırmaya yönelik gerekli önlemlerin alınmasında önerilerde bulunmak amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Örnekler Eylül 2014 – Şubat 2015 tarihlerinde toplanmıştır. Alınan örnekler ELISA yöntemiyle okunmuştur. Çalışma sonucunda, incelenen toplam 60 devam sütü örneğinin hepsinde AFM1 saptanmış olup, 37 örnekte ise Türk Gıda Kodeksi’ne göre kabul edilebilir sınırlar içerisinde AFM1 bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi’ne göre 23 örnekte sınırları aşan devam sütü örneği tespit edilmiştir (Tablo 2).

A, B, C, D, G firmalarının ortalama AFM1 değerleri Türk Gıda Kodeksinde (TGK) belirtilen maksimum bulaşan değerinden (0.05ppb) daha büyüktür. A, B, C, D, G firmalarına ait ortalama değerler standart değerden yüksektir fakat fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. E ve F firmalarına ait ortalama değerler ise standart değerden yüksektir ve fark önemli bulunmuştur. Risk potansiyeli taşıma ihtimali olan aflatoksin miktarları, Türk Gıda Kodeksi’ne göre değerlendirilmiştir; Bu değerler sütte; 0.05µg/kg, süt tozunda (dry milk); 0.5µg/kg, peynirlerde; 0.25µg/kg, bebek mama ve devam formüllerinde; 0.020µg/kg olarak bildirilmektedir. Çalışmada, incelenen örneklerin 23’ünde tespit edilen AFM1 seviyelerinin Türk Gıda Kodeksi kriterleri dikkate alındığında, kabul edilebilir sınırların üstünde olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

A, B, C, D, E, F, G Firmalarına ait devam sütü örneklerine ait ortalama değerler standart değerden yüksektir. Fark istatistiksel olarak önemlidir. Bu nedenle devam sütlerinde AFM1 varlığının bulunması önemli bir risk oluşturduğunu düşünerek çalışmamızda Türkiye’de yaygın olarak tüketilen devam sütü ürünlerinde AFM1

miktarları araştırılmıştır. Süt ve süt ürünlerinde aflatoksin tespiti için ince tabaka kromatografisi (thin layer chromatography=TLC), ELISA ve yüksek performans sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography) kullanılmaktadır. Bu iki yöntem içinde ELISA, duyarlılığının yüksek ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle, sütteki AFM1 analizinde yaygın kullanılan bir metot olduğu bilinmektedir (Amra 1998, Sarımehtemoğlu ve ark. 2004).

Bu çalışmada da, bahsedilen avantajlarından dolayı ELISA yöntemi kullanılmıştır. Birçok ülkede ve ülkemizde yapılan birçok çalışmada süt ve süt ürünlerinde AFM1 düzeyini belirlemek için analiz yapılmıştır (Bakırcı 2001, Sarımehtemoğlu ve ark. 2004, Atasever ve ark. 2006).

Bizim çalışmamızda da, toplam 60 süt örneğinden % 38'da, AFM1 miktarının Türk Gıda Kodeksi'ne göre kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğu görülmüştür. Süt ve süt ürünlerindeki aflatoksin M₁'in meydana gelmesi çevre koşullarına bağlı olduğundan şartların düzeltilmesi problemin daha basit ve ucuz yollardan ortadan kaldırılmasını sağlayacaktır (Galvano ve ark. 1996, Franco ve ark. 1998, Akdemir 2001, Özmenteşe 2002,

Van Egmond ve Jonker 2003, Akdemir ve Altıntaş 2004). Devam sütlerinde kabul edilebilir seviyenin üstünde AFM1 varlığı risklidir ve kontrolün gerekli olduğu açıktır. Özellikle yemlerde aflatoksin oluşumunun önlenmesi için, yem, süt ve süt ürünleri alanında faaliyetde olan kişi ve kuruluşların, yem ve ham maddelerinde AFB₁, süt ve süt ürünlerinde ise AFM1 olup olmadığının önemi ve üretim koşulları konusunda bilgilencmelerinin sağlanması, yemlerde AFB₁, süt ve ürünlerinde ise AFM1 olup olmadığının düzenli kontrollerinin yapılması önemlidir.

İlave olarak, Türk gıda kodeksinin Bulaşanlar Yönetmeliğinde 19.12.2012 yılında yayınlanan yeni değişiklikte limitler "Bebek formülleri ve devam formülleri (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)" için Aflatoksin M₁ üst limiti 0.025µg/kg olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamız planlandığı tarih daha önce ve elimizdeki Kitin cut-off değeri 0.05 olduğu için ELISA yöntemine göre değerlendirme yapılmıştır. Daha hassas konsantrasyonları ölçme imkanı sağlayacak olan LC/MS-MS yöntemiyle AFM1 konsantrasyonları belirlemek daha doğru sonuçlar verebilecektir.

Kaynaklar

- Asan, A. 2004. *Aspergillus, Penicillium* and related species reported from Turkey. *Mycotaxon*, 89: 155-157.
- Akdemir, Ç. 2001. *Ankara'da işlenen sütlerde Aflatoksin M₁ varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akdemir, Ç. & Altıntaş, A. 2004. Ankara'da işlenen sütlerde aflatoksin M₁ varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 51: 175-179.
- Amra, H.A. 1998. Survey of aflatoxin M₁ in Egyptian raw milk by ELISA. *Revue de Medicina Veterinaria*, 149: 695.
- Atasever, M., Nizamlioğlu, M., Özturan, K., Karakaya, Y. & Ünsal, C. 2006. Erzurum bölgesinde tüketime sunulan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin M₁ yönünden İncelenmesi, II. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi Bildiri Kitabı, İstanbul.
- Bakırcı, I. 2001. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, 12: 47-51.
- Birdane, Y., Akaya, L., Baskaya, R., Cemek, M. & Bulut S. 2006. Afyonkarahisar'da tüketime sunulan UHT sütler ile çiğ sütlerdeki AFM₁ miktarının belirlenmesi, 2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, İstanbul.
- Franco, C.M., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Cepeda, A., Mahuzier, G. & Prognan, P. 1998. Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q₁, M₁ and P₁ fluorescence and chromatographic studies. *Journal of Chromatography A*, 815: 21-29.
- Galvano, F., Galofaro, V. & Galvano, G. 1996. Occurrence and Stability of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. *Journal of Food Protection*, 59: 1079-1090.
- Gomez-Arranz, E. & Navarro-Blasco, I. 2010. Aflatoxin M₁ in Spanish infant formulae: Occurrence and dietary intake regarding type, protein-base and physical state. *Food Additives Contaminants. Part B Surveillance*, 3: 193-199.
- Kamkar, A.A. 2005. Study on the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, 16 (7): 593-599.
- Mead, M. 2010. Contaminants in human milk weighing the risks against the benefits of breastfeeding. *Environmental Health Perspectives*, 116: A426-A434.
- Özmenteşe, N. 2002. *İstanbul piyasasından sağlanan süt ve süt ürünlerinin aflatoksin B₁ ve M₁ içerikleri yönünden yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması*. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Sarımehtemoğlu, B., Küplülü, Ö. & Çelik, T.H. 2004. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control*, 15: 45-49.
- Sümer, S. 2006. *Genel Mikoloji*. 1. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Van Egmond, H.P. & Jonker, M.A. 2004. Worldwide regulations on aflatoxins-the situation in 2004. *Journal of Toxicology: Toxin Review*, 23: 273-293.

BAZI HERBİVOR BÖCEKLER HAKKINDA BİYOLOJİK GÖZLEMLER

Seda Emel TEK*, Zühal OKYAR

Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Balkan Yerleşkesi, 22030, Edirne

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

Alınış (Received): 03 Ekim 2016, Kabul (Accepted): 29 Kasım 2016, Erken Görünüm (Online First): 26 Ocak 2017, Basım (Published): 15 Haziran 2017

Özet: 2013-2016 döneminde Trakya Bölgesi'nde yapılmış arazi çalışmaları sırasında örneklenen herbivor özellikteki *Archips rosana* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae), *Melitaea didyma* (Esper) (Lep.: Nymphalidae), *Melitaea cinxia* (Linnaeus) (Lep.: Nymphalidae), *Allophyes oxyacanthae* (Linnaeus) (Lep.: Noctuidae), *Aporia crataegi* (Linnaeus) (Lep.: Pieridae), *Periclistus brandtii* (Ratzeburg) (Hymenoptera: Cynipidae), *Lymantria dispar* (Linnaeus) (Lep.: Erebidae) ve *Mustha spinosula* (Lefèbvre) (Hemiptera: Pentatomidae)'nin biyolojik bazı özellikleri laboratuvar ortamında gözlenmiş ve bulgular değerlendirilmiştir. *A. rosana* ve *M. didyma* larvalarında karnivor ve kanibalizm davranışları, *A. oxyacanthae* ergin dişisinin partenogenez yolu ile yumurta üretmesi, *M. spinosula* ergininin *L. dispar* larvaları ile olan birlikteliğinde gösterdiği savunma/predatör davranışı ve *P. brandtii*'nin *Pyrus communis* (Linnaeus) bitkisi ile olan birlikteliği ilk kez gözlenen durumlar olmuştur. Ayrıca *Melitaea cinxia* larvasından *Erycia festinans* (Meigen) (Diptera: Tachinidae) parazitoiti elde edilmiş olup, *E. festinans* türü Türkiye için yeni bir dipter kaydı olmuştur. *E. festinans* *M. cinxia* ile olan birlikteliği Türkiye için yeni bir parazitoit-konak kayıdır.

Anahtar kelimeler: Böcek davranışı, karnivor, kanibalizm, predasyon, partenogenez, savunma, parazitoit.

Biological Observations on Some Herbivorous Insects

Abstract: Some biological characteristics of the herbivorous *Archips rosana* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae), *Melitaea didyma* (Esper) (Lep.: Nymphalidae), *Melitaea cinxia* (Linnaeus) (Lep.: Nymphalidae), *Allophyes oxyacanthae* (Linnaeus) (Lep.: Noctuidae), *Aporia crataegi* (Linnaeus) (Lep.: Pieridae), *Periclistus brandtii* (Ratzeburg) (Hymenoptera: Cynipidae), *Lymantria dispar* (Linnaeus) (Lep.: Erebidae) and *Mustha spinosula* (Lefèbvre) (Hemiptera: Pentatomidae) obtained from Thrace Region during field studies in the period of 2013-2016 were monitored in laboratory conditions and the observations were evaluated. The carnivorous behaviour of *A. rosana* and *M. didyma* larvae, egg production by adult females of *A. oxyacanthae* through parthenogenesis, the defense/predatory behaviour of *M. spinosula* adults on *L. dispar* larvae and the association of *P. brandtii* with *Pyrus communis* (Linnaeus) plant are the observations reported for the first time. Furthermore, from *Melitaea cinxia* larva, the parasitoid *Erycia festinans* (Meigen) (Diptera: Tachinidae) emerged. *E. festinans* is a new record for Diptera fauna of Turkey. Correspondingly, *M. cinxia* and *E. festinans* is a new host-parasitoid association for Turkey.

Key words: Insect behaviour, carnivore, cannibalism, predation, parthenogenesis, defence, parasitoid.

Giriş

Böcekler tür sayısı bakımından dünya üzerinde yaşayan tüm organizmaların yarısından daha fazla bir çoğunluğa sahiptir. Dünyadaki toplam biyokütlenin en geniş parçasını oluşturan bitkiler üzerinden besinini karşılayan herbivor böcekler ise bu yığının yaklaşık yarısını oluştururlar. Bu yoğun çeşitlilik, türlerin etkileşimde olduğu çevresi ile de birleşince kompleks bir trofik ağı beraberinde getirmektedir. Canlılar arasındaki etkileşimler komünite dinamiklerini etkilemekte ve aynı zamanda da komünite dinamikleri tarafından bu ilişkiler etkilenebilmektedir (Schoonhoven ve ark. 2005, Stam ve ark. 2014). Böcekler arasındaki etkileşimlere dair öğrenilecek her bilgi (doğal düşmanlar, rekabet, konukçu seçimleri, davranışsal gözlemler ve bunların altında yatan kimyasal bilgiler, bitki bileşikleri vb.), biyokontrol çalışmalarından, bitki, böcek ve doğal alanların

korunmasına kadar birçok alanda faydalı olacaktır (Tunca ve ark. 2011).

Bu çalışmada 2013-2016 yılları arasında Trakya Bölgesi'nde yürütülen farklı çalışmalar sırasında bazı herbivor böcekler hakkında yapılan gözlemler raporlanmıştır. Çalışmada gözlemlenen bu durumlar, mevcut literatür ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

Materyal ve Metot

Trakya Bölgesi'nde, 2013-2016 yılları arasında vejetasyon dönemlerinde yapılan arazi çalışmaları sırasında toplanan larva, pupa ve ergin evrelerindeki herbivor böcekler, üzerinde bulunduğu bitki ile birlikte laboratuvara getirilmiş ve yetiştirilmiştir. Böceklerin arazide toplama aşaması, bitkiyi silkeleme ve gözle kontrol metotları ile yapılmış olup, laboratuvarında

yetiştirme aşaması ise içerisinde toplandığı bitkiyi içeren 10x10 cm ve 10x15 cm ebatlarında üzeri gazlı bez ile örtülü plastik kaplar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Yetiştirme süresince laboratuvar sıcaklığı 27°C ve nem %52 seviyesinde tutulmuştur. Bu süreçte böcekler gözlemlenmiş ve farklı davranışlar not edilmiştir. Yetiştirme kaplarında ergin hale ulaşan böcekler tayin edilmiş olup, Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Entomoloji Müzesi'nde muhafaza edilmektedir.

Sonuçlar ve Tartışma

Archips rosana (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae)

A. rosana'nın ait olduğu Tortricidae familyası, türlerin birçoğu larva halinde iken konukçu olduğu bitkilerin yapraklarını bükerek kendisine bir yuva oluşturduğu için "yaprak bükücü" olarak adlandırılmaktadır. Larvalar beslenme ve pupa oluşumu evrelerini bükükleri bu yaprak yuvalarda tamamlamaktadır. *A. rosana* yaprakların yanı sıra konak bitkinin çiçeklerinden, tomurcuklarından ve ufak meyvelerinden de beslenmesi ürün kayıplarına yol açmakta ve meyve verimini düşürmektedir (Meijerman ve Ulenberg 2000).

A. rosana, Rosaceae familyası dahil bir çok bitki familyası üzerinden beslenen polifag bir türdür. Türün larva aşamasında üzerinde beslendiği bilinen ve Paleartik Bölge'de dağılım gösteren konak bitkiler Aceraceae, Betulaceae, Caprifoliaceae, Cornaceae, Ericaceae, Fabaceae, Fagaceae, Grossulariaceae, Juglandaceae, Pinaceae, Rhamnaceae, Rosaceae (*Crataegus* sp., *C. douglasii* Lindl, *Malus* sp., *M. domestica* Borkhausen, *M. sylvestris* Miller, *Prunus* sp., *P. armeniaca* Linnaeus, *P. amygdalus* Batsch, *P. avium* Linnaeus, *P. ceracus* Linnaeus, *P. domestica* Linnaeus, *P. mahaleb* Linnaeus, *P. persica* (Linnaeus), *P. spinosa* Linnaeus, *P. virginiana* Linnaeus, *Pyrus* sp., *P. communis* Linnaeus, *Ribes aureum* Pursh, *R. rubrum* Linnaeus, *Rosa* sp., *R. canina* Linnaeus, *Rubus* sp., *R. parviflorus* Nuttall, *R. rugosa* Smith, *R. idaeus* Linnaeus), Rutaceae, Salicaceae ve Ulmaceae familyalarına dahildir (Özdemir ve ark. 2005, Brown ve ark. 2008, Polat ve Tozlu 2010). Çalışma sırasında *A. rosana* bireyleri arazide *Pyrus communis* (Rosaceae) üzerinden larva halinde iken toplanmış ve bu bitki ile beslendiği laboratuvarında gözlenmiştir. Bununla birlikte larvaların karnivor beslenme davranışı gösterdiği de laboratuvar şartlarında gözlenen bir durum olmuştur. Tortricidae familyasına ait larvaların 2 farklı karnivor beslenme davranışı gösterdiği saptanmıştır.

Bir örnekleme kutusunda, iki *A. rosana* larvası arasında yamyamlık (kanibalizm) durumu gözlemlenmiştir. Şekil 1'de beyaz çember içerisinde gösterilen larvanın, diğer larvanın abdomeninin ucunu ısırarak vücut sıvısını çıkarttığı ve sıvı ile beslendiği görülmüştür.

Bir diğer örnekleme kutusunda ise iki *A. rosana* larvasının bir tanesinden Tachinidae parazitoidinin çıkıp fiçı pupa ördüğü ve bu pupanın bir kısmının aynı kutu içindeki sağlıklı olan diğer *A. rosana* larvası tarafından ısırılmış olduğu görülmüştür (Şekil 2). Birkaç gün sonra

sağlıklı olan larva pupa oluşturmuş ve metamorfoz süresi sonunda pupadan ergin birey çıkmıştır.



Şekil 1. *Archips rosana* larvaları arasında yamyamlık.

Sonuç olarak, her iki durumda da, normal şartlarda herbivor beslendiği bilinen *A. rosana*, muhtemelen ortamdaki besin sıkıntısı nedeniyle hem kendi türünden bir larva üzerinde hem de kendi türünü parazitize etmiş olan bir dipter üyesinin pupası üzerinden karnivor olarak beslenmiştir.



Şekil 2. *Archips rosana* larvasının Tachinidae pupası üzerinde predasyonu: (A) Predasyonu yapan sağlıklı *A. rosana* larvası. (B) Parazitoidlenmiş *A. rosana* larvası. (C), (D) Parazitize *A. rosana* larvasından çıkmış Tachinidae larvasının fiçı pupası (sağlıklı larva tarafından ısırılan bölge beyaz çember içine alınmıştır).

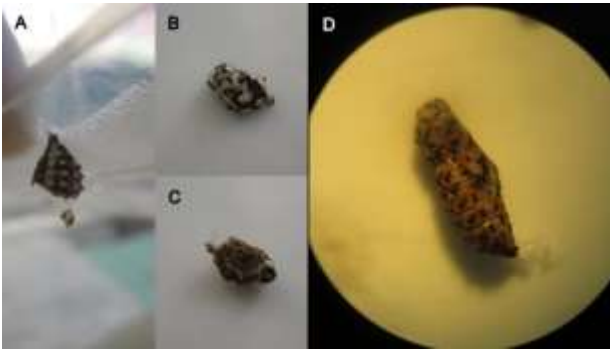
Besin kaynağı yetersiz olduğunda görülebilen yamyamlık, bunu gerçekleştiren canlıların yaşam süresini uzatabilir ya da yüksek protein içeren bu besinlerin tüketimi ile yamyamlığın gelişim ve üreme başarısını arttırabilir (Joyner ve Gould 1985, Kakimoto ve ark. 2003, Richardson ve ark. 2010, Wang ve Daane 2014). *A. rosana* hakkında literatürde karnivor ya da yamyamlık açısından bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bununla birlikte, farklı *Archips* ya da Tortricidae türlerinin larvaları hakkında yamyamlık bulguları mevcuttur (Smirnoff 1967, Sullivan ve ark. 2011, Wang ve Daane 2014). Wang ve Daane (2014)'in çalışmasında, araştırılan bir tortricid türünde (*Choristoneura rosaceana* (Harris)), türün larvasının sağlıklı olan larvadan ziyade, bir braconid türü tarafından parazite olmuş larvaya yönelik bir yamyamlık davranışı gösterdiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada *A. rosana* hakkında gözlemlenen iki farklı karnivor beslenme durumu da besin yetersizliğinin olduğu bir periyotta meydana gelmiştir. Besin yetersizliği de bir taraftan *A. rosana* larvaları arasında yamyamlığı; diğer bir taraftan da *A. rosana* herbivorunun, türdeşinden çıkmış dipter parazitoidinin pupasına yönelik gerçekleştirdiği predatörlük davranışını tetiklemiş olabilir.

Melitaea didyma (Esper) (Lepidoptera: Nymphalidae)

Bu kelebek türünün larvaları, *Plantago* sp. (Plantaginaceae); *Valeriana* sp. (Valerianaceae); *Antirrhinum* sp., *Digitalis* sp., *Linaria* sp., *Verbascum* sp., *Veronica* sp. (Scrophulariaceae); *Stachys* sp. (Labiatae); *Centaurea* sp.; *Trifolium* sp. (Papilionaceae) türlerine dahil olan bazı bitki türlerini besin olarak kullanmaktadır (Tolman 1997, Baytaş 2008, BRC 2011).

Araziden toplanmış iki adet *M. didyma* larvası aynı örnekleme kabı içerisinde yetiştirilmiştir. Larvalardan bir tanesi pupaya girmiş ve birkaç günün sonunda diğer larvanın ortamdaki besin yetersizliğinden dolayı aynı kaptaki pupa halindeki türdeşi üzerinden beslendiği görülmüştür (Şekil 3). Yamyam larva sonrasında pupasını oluşturmuş fakat muhtemelen ortam şartlarından ötürü pupadan ergin olarak çıkamamıştır. *M. didyma* larvasının karnivor ya da yamyam beslenmesi hakkında bir bilgiye literatürde rastlanmamıştır. Bununla birlikte bazı araştırmalarda, türün ait olduğu altfamilyaya (Melitaeinae) ait bazı türlerde yumurta ve larva yamyamlığının bulunduğu belirtilmiştir (Clark ve Faeth 1998, Kuussaari ve ark. 2004).



Şekil 3. *Melitaea didyma* larvasının pupa üzerindeki yamyamlığı: (A), (B), (C) Yamyamlığa uğramış olan pupanın parçaları. (D) Yamyam larvanın beslenmeden sonra oluşturduğu pupa.

Melitaea cinxia (Linnaeus) (Lepidoptera: Nymphalidae) ve *Erycia festinans* (Meigen) (Diptera: Tachinidae)

Melitaea cinxia türüne ait larval bireyler *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) yaprakları üzerinde gregar halde beslenirken gözlemlenmiş ve larvalar besin bitkileri ile toplanarak laboratuvarında yetiştirilmiştir. Larva aşamasında lepidopter bireylerin bir tanesinden tachinid larvasının çıkış yapıp konak larva yakınında kendi pupasını oluşturmuş olduğu gözlenmiştir. Ergin halde pupasından çıkan dipter, *Erycia festinans* olarak teşhis edilmiştir.

Erycia tachinid cinsinin, Melitaeini lepidopterleri üzerinde spesyalist bir parazitoit olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Melitaeini'ye dahil olan *Melitaea spp.* ve *Euphydryas spp.*'ye ait türleri parazitlediği iyi bilinmektedir. (Herting 1960, Van Nouhuys ve Hanski 2004).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda *Erycia* cinsine ait sadece *fascinata* türü tespit edilmiş olup; bu tachinid türünün, *Verbascum* sp. (Scrophulariaceae) üzerinden beslenen *Melitaea didyma* türünü konak olarak kullandığı kaydedilmiştir (Bayram ve Kara 1998).

Erycia festinans dipter türünün ülkemizde varlığına dair yayınlanmış bir kayıt bulunmamaktadır. Bununla birlikte *E. festinans*'ın Bulgaristan ve Yunanistan'daki varlığı, türün Türkiye'de de bulunmasını beklenir kılmaktadır (Fauna Europaea 2014).

Dünyada yapılan çalışmalarda *Erycia festinans*'a ait bireylerin Avrupa ve Sibirya coğrafik bölgelerinde, larva evresinde olan *Melitaea cinxia* ve *Melitaea didyma* türlerini konak olarak kullandığı tespit edilmiştir (Ford ve ark. 2000, Wahlberg ve ark. 2001, Van Nouhuys ve Hanski 2004). Türkiye'de ise hem *Erycia festinans* tachinidinin, hem de türün *Melitaea cinxia* ile olan konak ilişkisinin ülkemizdeki varlığı bu çalışma ile ilk kez bulgulanmıştır.

Allophyes oxyacanthae (Linnaeus) (Lepidoptera: Noctuidae)

Larva aşamasında iken *Prunus spinosa* Linnaeus (Rosaceae) üzerinden toplanan larva laboratuvar şartlarında beslenerek yetiştirilmiştir. Ergin hale gelen dişi bireyin, yetiştirme kabının tavanına partenogenez ile yumurtalar bırakmış olduğu görülmüştür. Yumurtalar larva oluşumu için bekletilmiş fakat herhangi bir larva çıkışı olmamıştır. Literatürde *A. oxyacanthae* türünün partenogenez ile yumurta ürettiği hakkında bir bilgiye ulaşılamamıştır. Partenogenetik üreme, eşeysel üremeye uygun olmayan ortam şartlarında ya da erkeklerin sayıca az olduğu durumlarda türün neslinin devamlılığını sürdürme açısından oldukça faydalıdır. Ancak partenogenetik üremenin sürekliliği genetik çeşitliliği sınırlayacak ve türün kendileşmesini sağlayacaktır. *A. oxyacanthae* türünün partenogenetik üremeyi hangi çevresel tehdit altında gerçekleştirdiği konusu detaylı bir çalışmayı gerektirmektedir.

Aporia crataegi (Linnaeus) (Lepidoptera: Pieridae), Periclistus brandtii (Hymenoptera: Cynipidae)

A. crataegi larvaları, yuvası ile beraber *Pyrus communis* Linnaeus (Rosaceae) bitkisinden alınarak laboratuvara getirilmiştir. Yuva içerisine bakıldığında, Şekil 4'de gösterildiği üzere, 4 beyaz parazitoid kozası ve kozalar etrafında az hareket eden *A. crataegi* larvaları fark edilmiştir. Beyaz kozalardan *Periclistus brandtii* türüne ait ergin bireyler çıkmıştır. Bununla birlikte *P. brandtii* gal içlerinde yerleşimci konumda bulunarak yaşamını sürdüren bir türdür ve gal dışında bir yerde yerleşimci olduğuna dair bir bilgi bulunmamaktadır.



Şekil 4. *Pyrus communis* üzerinde bulunan *Aporia crataegi* yuvasında gözlenmiş *Periclistus brandtii* cynipid kozaları: (A) Yuva içerisinde gözükten beyaz renkteki *P. brandtii* kozaları (kozalar beyaz çember içine alınmıştır). (B) Başka bir açıdan yuva içerisinde gözükten *A. crataegi* larvaları (larvalar beyaz çember içine alınmıştır).

Cynipid gal yerleşimcileri, *Periclistus brandtii* türünde olduğu gibi, gal oluşturma yetilerini yitirmiş olmalarına rağmen, gal arıları gibi fitofag böceklerdir. Gal yerleşimcilerinin larvaları gal içerisindeki odacıklarda ya da galin dış dokularında beslenip büyür ve gelişebilir. Eğer yerleşimci türün gal içerisindeki birey sayısı çok fazla olursa, ortamdaki diğer gal arılarına toksik etki yapıp onları öldürebilirler. *Periclistus* türleri, *Rosa* türlerinde gal yapan *Diplolepis* sp. gallerinde yerleşimci konumundadır (Ronquist 1994, Katılmış ve Kıyak 2011). *Periclistus* larvaları yaz boyunca gal odacıklarında bulunur, kışı pupa öncesi evrede geçirir ve baharda da pupa olurlar; sonrasında ergin olarak gallerden çıkar, çiftleşir ve yumurtlamak için olgunlaşmamış bir gal seçerler (Shorthouse 1973, 1993, Shorthouse ve Leggo 2002, Katılmış ve Kıyak 2011).

Periclistus cinsinin ait olduğu Synergini cynipidleri, *Rosa* sp. üzerindeki Cynipidae (Hymenoptera) türlerinin sebep olduğu gallerin dışında ayrıca *Quercus* sp. üzerindeki Cecidomyiidae (Diptera) türlerinin oluşturduğu gallerde yerleşimci olabilmektedir (Katılmış ve Azmaz 2015). Cecidomyiidae taksonuna ait kimi türlerin ayrıca *Pyrus communis* bitkisinde de yaprakları şişirip bükerek gal oluşumuna neden olabildiği literatürde belirtilmiştir (Skuhrová ve ark. 2007).

Bu çalışmadaki gözlemede, Cecidomyiidae türlerinden birisinin *Pyrus communis* üzerinde oluşturduğu gal içerisine *Periclistus brandtii* bireyi yumurtalarını bırakmış olabilir. Bu kompleksin yakınlarına da *Aporia crataegi*'nin yumurta bırakması (veya türlerin biyolojik zamanına göre tam tersi), sonrasında da lepidopter yumurtalarının çatlayıp ilk instarların bu bölgelerden beslenip yuvayı bu gal etrafına örmeleri, ya da bu galde saklanmaları böyle bir sonuca neden olmuş olabilir.

Bununla birlikte *Periclistus* türleri *Rosa* sp. (Rosaceae) üzerindeki *Diplolepis* spp. ve *Liebelia* sp. gallerinde; *Smilax* sp. (Smilacaceae) üzerindeki *Diastrophus smilacis* Ashmead gallerinde gözlendiği literatürde bildirilmiştir (Penzes ve ark. 2012). *Periclistus* türlerinin *Pyrus communis* türü ya da cinsi ile bir ilişkide olduğuna dair bilgiye daha önceki literatür çalışmalarında rastlanmamıştır. Bu çalışmada gözlemlenen durumda ise

her olasılıkla *Periclistus brandtii* türünün *Pyrus communis* ile bir birlikteliği bulunduğu sonucuna varılmaktadır ve bu yeni bir gözlem bulgusudur.

Lymantria dispar (Linnaeus) (Lepidoptera: Erebidae) ve *Mustha spinosula* (Lefebvre) (Hemiptera: Pentatomidae)

Cydonia oblonga Miller (Rosaceae) üzerinden toplanan *Mustha spinosula* ergin bireyleri (2 birey), aynı zamanda aynı bitkiden toplanmış olan *Lymantria dispar* larvaları (5 birey) ile beraber laboratuvar koşullarında 1 gün aynı örnekleme kutusu içerisinde bırakılmıştır. Bu süre sonunda kutu kontrol edildiğinde tüm lepidopter larvalarının ölüm katılığında olduğu (ölmüş olduğu) ve kutu içerisinde kahverengimsi-kırmızımsı lekeler bulunduğu görülmüştür.

L. dispar türü pek çok ülkede ağaç ve çalılara zarar derecesi fazla olan polifag ve istilacı bir türdür (Alford 2012). Kuzey yarım kürede Rosaceae familyasına dahil pek çok türü de içeren, 300'den fazla bitki ile beslenmektedir (GOERT 2003). Türün Palearktik Bölge'de larva aşamasında beslendiği bilinen bitkiler: Aceraceae, Anacardiaceae, Betulaceae, Fabaceae, Fagaceae, Juglandaceae, Myricaceae, Oleaceae, Pinaceae, Polygonaceae, Rosaceae “(*Crataegus* sp., *C. monogyna* Jacquin, *Cydonia* sp., *Malus* sp., *M. pumila* Miller, *Prunus* sp., *P. spinosa* Linnaeus, *P. domestica* Linnaeus, *Pyrus* sp., *P. communis* Linnaeus, *Rosa* sp., *Rubus* sp.)” Salicaceae, Tamaricaceae, Tiliaceae ve Ulmaceae taksonlarına dahildir (Lechowicz ve Mauffette 1986, Robinson ve ark. 2010, BRC 2011, Molet 2012).

M. spinosula türünün Aquifoliaceae, Cupressaceae, Fabaceae, Fagaceae, Juglandaceae, Oleaceae, Platanaceae, Rosaceae (*Crataegus* sp., *C. azarolus* Linnaeus, *Pirus malus* Linnaeus, *Prunus* sp., *P. amygdalus* Batsch) ve Salicaceae familyaları üzerinden beslendiği ya da bu bitkiler üzerinde bulunmuş olduğu bilgisi literatürde mevcuttur (Lodos ve ark. 1998, Kanat ve Akbulut 2005, Rider 2015).

M. spinosula türünün ait olduğu Pentatomidae familyası, rahatsız edildiğinde salgıladığı kötü kokuları ile bilinmektedir. Krall ve ark. (1999)'nın çalışmasında *Cosmopepla bimaculata* (Thomas) pentatomidinin salgıladığı kimyasalların predatörlerine karşı kullanılma durumları test edilmiştir. Türün genellikle çok rahatsız edilmedikçe bu kokuyu kullanmadan yürüyerek uzaklaştığı, ya da, ancak çok üzerine gelindiğinde önemli miktarda kokuyu saldırdığı bulunmuştur. Ayrıca bu kötü kokunun predatörler tarafından algılandığında, predatörün kokuyu salgılayan böceğin olduğu bölgeden uzaklaşmasında başarılı olduğu ve hatta avcılarının kokulu böcekleri gördüğünde dahi bölgeden kaçındıkları saptanmıştır. Bu duruma ek olarak, avcılarının bu kötü koku salan böcekleri çiğnemeleri, ağızlarında hoş olmayan tat ile birlikte uzun süren bir acı oluşmasına neden olmuştur (Krall ve ark. 1999).

Bu çalışmada gözlemlenen durumda ise; *M. spinosula* pentatomidi, aynı beslenme kabında kaldıkları *L. dispar* larvalarını tehdit olarak algılayıp kimyasal yaymış ve

larvalar da kimyasalın etkisiyle ölmüş olabilir. Diğer bir yandan, *M. spinosula*'nın fitofag özelliği bulunmasına rağmen türün bireyinin *L. dispar* larvaları üzerinden beslenmiş olma olasılığı da bulunmaktadır. *M. spinosula*'nın biyolojisi hakkında literatürde fazla bilgi bulunmamaktadır. Türün ait olduğu Pentatominae altfamilyası ve Halyini tribe'na ait bazı türler predatör özellik göstermektedir (Rider 2015). Bazı predatör pentatomid türlerinin tükürük bezlerindeki sıvıları kullanıp avlarını hızlı bir şekilde paralyze ederek ölümlerine neden oldukları ve geriye kurumuş halde vücut örtüsü kaldığı bilinmektedir (Martinez ve ark. 2014; Hyodo ve ark. 2014). Larvaların ölü hallerinin katılaşmış bir görüntüye sahip olması ve kap içerisinde vücut sıvısı lekelerinin görülmesi de bu tezleri destekleyebilir. Larvaların ölüm nedenlerinin, *M. spinosula*'nın salgıladığı kimyasalın etkisiyle mi yoksa predatör

davranışı nedeniyle mi olduğunu belirlemek için yeni gözlemler ile tekrar edilmesi gereklidir. *L. dispar* larvaları laboratuvar gözlemlerine göre oldukça obur ve dayanıklı larvalardır. Besin kalitesi sebebiyle ölme olasılıkları az denebilir. *L. dispar*, yüksek polifaglık özelliği göstermesi ile birlikte ekonomik önemi olan bir zararlıdır. Bu zararlıya yönelik yapılabilecek biyolojik mücadele çalışmalarında parazitoidlerle birlikte pentatomidlerin de kullanılma olasılığı olabilir.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan bulguların bir kısmı birinci yazarın yüksek lisans tezinin bir bölümüdür. Tür tanımlamaları ve katkıları için Doç. Dr. Yusuf Katılmış (Cynipidae), Doç. Dr. Meral Fent (Pentatomidae) ve Prof. Dr. Kenan Kara'ya (Tachinidae) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Alford, D.V. 2012. *Pests of Ornamental Trees, Shrubs and Flowers: A Colour Handbook*. CRC Press, Boca Raton (FL), 480 s.
- Bayram, Ş. & Kara K. 1998. Türkiye Tachinidae (Diptera) faunası için yeni bir kayıt *Erycia fasciata* Villeneuve 1924. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 22(3): 217-224
- Baytaş, A. 2008. *Türkiye'nin kelebekleri: Doğa rehberi*, NTV Yayınları, İstanbul.
- BRC, Biological Records Centre - Database of insects and their food plants. 2011. <http://www.brc.ac.uk/dbif/> (Erişim: Eylül 2016).
- Brown, J.W., Robinson, G. & Powell, J.A. 2008. Food plant database of the leaf rollers of the world (Lepidoptera: Tortricidae). Version 1.0. <http://www.tortricid.net/foodplants.asp> (Erişim: Eylül 2016).
- Clark, B.R. & Faeth, S.H. 1998. The evolution of egg clustering in butterflies: a test of the egg desiccation hypothesis. *Evolutionary Ecology*, 12(5): 543-552.
- Fauna Europaea. 2014. Version 2.6. <http://www.faunaeur.org>
- Ford, T.H., Shaw, M.R. & Robertson, D.M. 2000. Further host records of some west Palaearctic Tachinidae (Diptera). *Entomologist's Record and Journal of Variation*, 112(1): 25-36.
- GOERT - Garry Oak Ecosystems Recovery Team. 2003. Invasive species in Garry oak and associated ecosystems in British Columbia. Victoria (BC). http://www.goert.ca/publications_resources/invasive_species.php (Erişim: Eylül 2016).
- Herting, B., 1960. *Biologie der Westpaläarktischen Raupenfliegen (Diptera: Tachinidae)*. Monographien zur angewandten Entomologie, 16: 1-188, Berlin.
- Hyodo, D., Himuro, C. & Fujisaki, K. 2014. Prey size affects the costs and benefits of group predation in nymphs of the predatory stink bug *Andrallus spinidens* (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Ethology*, 32(3): 173-178.
- Joyner, K. & Gould, F. 1985. Developmental consequences of cannibalism in *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 78: 24-28.
- Kakimoto, T., Fujisaki, K. & Miyatake, T. 2003. Egg laying preference, larval dispersion and cannibalism in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 96(6): 793-798.
- Kanat, M. & Akbulut, S. 2005. Determination of some pest insect species damaging oak forests in the south east Anatolia region (Kahramanmaraş) of Turkey. *Science and Engineering*, 8(2): 70-73.
- Katılmış, Y. & Kıyak, S. 2011. Further study on *Periclistus brandtii* (Ratzeburg, 1831) (Hymenoptera, Cynipidae) from Turkey. *Entomological News*, 122(1): 51-54.
- Katılmış, Y. & Azmaz, M. 2015. Investigation on the inquilines (Hymenoptera: Cynipidae, Synergini) of oak galls from inner western Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 39(1): 168-173.
- Krall, B.S., Bartelt, R.J., Lewis, C.J. & Whitman, D.W. 1999. Chemical defense in the stink bug *Cosmopepla bimaculata*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(11): 2477-2494.
- Kuussaari, M., Van Nouhuys, S., Hellmann, J.J., & Singer, M.C. 2004. *Larval biology of checkerspots*, Pp. 138-160. In: Ehrlich, P. R. & Hanski, I. (eds). *On the Wings of Checkerspots: A Model System for Population Biology*. Oxford University Press, Oxford and New York, 408 p.
- Lechowicz, M.J. & Mauffette, Y. 1986. Host preferences of the gypsy moth in eastern North American versus European forests. *Revue d'Entomologie du Québec*, 31(1): 43-51.
- Lodos, N., Önder, F., Pehlivan E., Atalay, R., Erkin, E., Karsavuran, Y., Tezcan, S. & Aksoy, S. 1998. *Faunistic Studies on Pentatomoidea: (Plataspidae, Acanthosomatidae, Cydnidae, Scutelleridae, Pentatomidae) of Western Black Sea, Central Anatolia and Mediterranean Regions of Turkey*. Ege University Press, İzmir, 75 s.
- Martínez, L.C., do Carmo Queiroz Fialho, M., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. 2014. Ultrastructure and cytochemistry

- of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma*, 251(3): 535-543.
22. Meijerman, L. & Ulenberg, S.A. 2000. Arthropods of economic Importance: Eurasian Tortricidae. World Biodiversity Database. <http://wbd.etibioinformatics.nl/bis/index.php> (Erişim: Eylül 2016).
 23. Molet, T. 2012. *CPHST Pest Datasheet for *Lymantria dispar asiatica**. USDA-APHIS -PPQ-CPHST.
 24. Özdemir, M., Özdemir, Y., Seven, S. & Bozkurt, V. 2005. Orta Anadolu Bölgesinde Kültür Bitkilerinde Zararlı Tortricidae (Lepidoptera) Faunası Üzerine Araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 45(1-4): 17-44.
 25. Penzes, Z., Tang, C.T., Bihari, P., Bozso, M., Schweger, S. & Melika, G. 2012. *Oak Associated Inquilines (Hymenoptera, Cynipidae, Synergini)*. Tiscia Monograph Series Volume 11, Szeged, 76 s.
 26. Polat, A. & Tozlu, G. 2010. Erzurum'da *Archips rosana* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae)'nın kısa biyolojisi, konukçuları ve parazitoidleri üzerinde araştırmalar, *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 34(4): 529-542.
 27. Richardson, M.L., Mitchell, R.F., Reigel, P.E. & Hanks, L.M. 2010. Causes and consequences of cannibalism in non-carnivorous insects. *Annual Review of Entomology*, 55: 39-53.
 28. Rider, D.A. 2015. Pentatomoidea Home page. North Dakota State University. <https://www.ndsu.edu/faculty/rider/Pentatomoidea/> (Erişim: Eylül 2016).
 29. Robinson, G.S., Ackery, P.R., Kitching, I.J., Beccaloni, G.W. & Hernández, L.M. 2010. HOSTS - A database of the world's lepidopteran host plants, Natural History Museum, London. <http://www.nhm.ac.uk/hosts> (Erişim: Eylül 2016).
 30. Ronquist, F. 1994. Evolution of parasitism among closely related species: phylogenetic relationships and the origin of inquilinism in gallwasps (Hymenoptera, Cynipidae). *Evolution*, 48(2): 241-266.
 31. Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J. & Dicke, M. 2005. *Insect-Plant Biology*. 2nd edn, Oxford University Press, Oxford, 440 p.
 32. Shorthouse, J.D. 1973. The insect community associated with galls of *Diplolepis polita* (Hym.: Cynipidae). *Quaestiones Entomologica*, 9: 55-98.
 33. Shorthouse, J.D. 1993. Adaptations of gall wasps of the genus *Diplolepis* (Hym.: Cynipidae) and the role of gall anatomy in cynipid systematics. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 165: 139-163.
 34. Shorthouse, J.D. & Leggo, J.J. 2002. Immature stages of the galler *Diplolepis triforma* (Hymenoptera: Cynipidae) with comments on the role of its prepupae. *Canadian Entomologist*, 134: 433-446.
 35. Skuhrová, M., Skuhrový, V. & Massa, B. 2007. Gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) of Sicily. *Naturalista Siciliano*, 31: 261-309.
 36. Smirnov, W.A. 1967. Effects of some plant juices on the ugly-nest caterpillar, *Archips cerasivoranus*, infected with microsporidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9: 26-29.
 37. Stam, J.M., Kroes, A., Li, Y., Gols, R., Van Loon, J.J., Poelman, E.H. & Dicke, M. 2014. Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 689-713.
 38. Sullivan, M., MacKinnon, D., Price, T., Biggs, A.R. & Blue, D. 2011. *Stone Fruit Commodity-based Survey Reference*. Cooperative Agricultural Pest Survey.
 39. Tolman, T. 1997. *Butterflies of Britain and Europe*. Harpercollins Pub Limited, London.
 40. Tunca, H., Kılınçer, N. & Özkan, C. 2011. Bitkiler, Herbivorlar ve Doğal Düşmanlar Arasındaki Trofik İlişkiler, *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 3(2) 37-45.
 41. Van Nouhuys, S. & Hanski, I. 2004. *Natural enemies of checkerspots*, Pp. 161-180. In: Ehrlich, P. R. & Hanski, I. (eds). *On the Wings of Checkerspots: A Model System for Population Biology*. Oxford University Press, Oxford and New York, 408 p.
 42. Wahlberg, N., Kullberg, J., Hanski, I. 2001. Natural history of some Siberian Melitaeini butterfly species (Melitaeini: Nymphalidae) and their parasitoids. *Entomologica Fennica*, 12(2): 72-77.
 43. Wang, X.G. & Daane, K.M. 2014. Cannibalism of parasitoid-attacked conspecifics in a non-carnivorous caterpillar. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 151(2): 112-121.

VALIDATION OF MICROBIOLOGICAL TESTING METHODS

Dilek YALÇIN DUYGU*, Abel Udo UDOH

Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi, Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları, Ankara.

*Corresponding author: e-mail: dilekduygu06@hotmail.com

Received (Alınış): 3 December 2016, Accepted (Kabul): 20 March 2017, Online First (Erken Görünüm): 17 April 2017, Published (Basım): 15 June 2017

Abstract: Method-validation is a method which proofs that a given analytical process, when applied well, produces findings which are suitable for a purpose and of acceptable standard. A process whereby an authentic information is given on an analytical method duly applied and enough to meet the needs and acceptable standards, is known as method-validation. The goal to validate a method therefore, is to make the findings of the method-validation reliable throughout the course of the study. With the above in mind, validating a method therefore, is for the purpose of making the obtained results reliable in the study. A laboratory should authenticate non-standard methods and laboratory-designed/developed methods. Validation studies should also be done when new equipment steps into the work or an important change occurs along the new chemicals. The method is carried out by a new personnel. A validation method that has not been used for a long time, demanded to be used during a study, is thought to affect the laboratory results. Laboratories need to make a policy and procedures for the selection and the use of analytical methods. The method will successfully meet or exceed the minimum standards recommended for accuracy, precision, selectivity, sensitivity, reproducibility, and stability.

Key words: Accuracy, precision, reproducibility, sensitivity, selectivity, validation.

Mikrobiyolojik Test Metotlarının Doğrulanması (Validasyonu)

Özet: Metot doğrulanması, amaca en uygun ve kabul edilebilir nitelikte sonuçları üretecek analitik metodun ortaya çıkarılması sürecidir. Doğrulanmış metodun hedefi bu metotla yapılmış sonuçlara güvenilirlik sağlamaktır. Laboratuvar, standart olmayan metotları, laboratuvar tarafından geliştirilen veya tasarlanan metotları geçerli kılmalıdır. Doğrulama çalışmaları yeni bir cihaz devreye girdiğinde ya da yeni kimyasallarda önemli bir değişiklik olduğunda da yapılmalıdır. Yöntem yeni bir personel tarafından uygulanır. Uzun süredir kullanılmayan ancak kullanılmasına gereksinim duyulan bir doğrulama yönteminin laboratuvar sonuçlarını etkilediği düşünülür. Laboratuvarların, analitik metotların seçimi ve kullanımı için bir yöntem ve prosedür belirlemeleri gereklidir. Metot, kesinlik, doğruluk, seçicilik, hassasiyet, tekrar edilebilirlik ve kararlılık için gerekli minimum standartları başarılı bir biçimde karşılamalı ya da aşmalıdır.

Anahtar kelimeler: Doğruluk, kesinlik, tekrar edilebilirlik, hassaslık, seçicilik, validasyon.

Introduction

Analytical methods are one of the basic tools in laboratory and have been defined or classified in various ways. The basic requirement should be that this method must meet the desired goal, in other words, be practical and suitable for the intended use. Methods can also be loosely classified as official, reference, screening or rapid, in-house and automated methods according to their purposes or their administrative propriety (Garfield *et al.* 2000). A method that is acceptable for its intended purpose is normally authenticated by a process known as Method Validation. Validating a method, therefore, serves as a way of authenticating that the analytical method receives acceptance for the targeted goal (McCully & Lee 1980, Green 1996). Validation or substantiation is the practical demonstration and the tendering of objective facts that the particular requirements for an intended use are met. Validation means, testing and confirmation towards providing a

standard proof that these specific requirements are for a particular use. The laboratory also confirms that standard methods used outside their targeted scope and amplifies/modifies the methods to show that they are right for the intended use (Elder *et al.* 1997, White *et al.* 2001, NELAC 2007, EA 2012).

In general, specificity, linearity, accuracy, precision, range, detection limit, quantitation limit, and robustness should constitute the methods submitted to the authorities. Submissions should embody works on specificity, linearity, range, detection limit, precision, robustness and quantitation. The procedures for authentication of a method mustn't be alienated from the actual development of the method conditions, since the initiators will not know, whether the method conditions are acceptable until validation studies are proved.

Table 1. Method validation tools (Garfield *et al.* 2000).

Validation Parameter	Description and validation characteristics
Spike or recovery	Adding clear quantities of pure substance to portions of previously analyzed material, and repeating the analysis using the same reagents and technique should enable recovery data.
Method comparison	Two different methods should be employed in analyzing standard or known materials.
Linearity	Spanning the range of the methods, with the analyte concentrations, are the materials with which they are determined. With using the least squares method, a regression line could be computed when linearity is not attainable, an algorithm specific for that analyte/matrix combination may be used.
Reference standards and standard reference materials	A standard of stated purity from which measurements are carried out at that location are derived. A substance with one or more properties correctly established for use in calibration in order to assess a method or for giving values to materials is known as standard reference material.
Certified reference materials	This is a material of the highest metrological quality in existence, one or more in number and whose values are authenticated by a technically standard procedure, followed by or linked with a certificate issued by the certified authority.
Duplicates and replicates	Repeated, independent determinations of the similar test sample through the same analyst at essentially the correct time and conditions of the entire analysis. Replicates may be considered as repetitions of the determinative step only.
Blanks	The reagent blank is the simplest type of blank, that the method is fully performed except for addition of the test portion. This tests the purity of reagents and also detects contamination of the analytical system from any source. Simulated test material used at times can give a better performance of blank determinations.
Collaborative study	This is the analysis by some laboratories with identical sample sets and can cover the range of applicability of a method found before to be good and practical, to record the characteristics of a method regarding accuracy, precision, sensitivity, range, specificity, limit of detection together with the limit of reliable measurement, selectivity, and practicality.
Validation by other laboratories	Validation of the method may be done by one or more outside laboratories.

The mechanisms of developing a method are also parts and parcels of validating it since the developer will not be able to know if the conditions as specified by the method would be adopted until validated. Findings of the validation studies may show that a change in the procedure is inevitable, and may need then revalidation processes may bringing out the necessity to make changes, requiring revalidation. For each validation study, the main method parameters are established and used for all the other subsequent validation steps for each and every validation, the main parameters established and used for all the future validation steps (Green 1996). The laboratory records all the results obtained, the procedure used for validation and issues a statement certifying that the method fits for the intended use. The statement as to whether the validation fit the purpose should be issued by the laboratory based on the results recorded (NELAC 2007). Table 1 lists the validation parameters and their detailed descriptions and validation properties.

Microbiological Method Validation

Technology for microbiological analyses is widespread (NELAC 2007). Isolation, enumeration, detection or identification of microorganisms and/or their metabolites or spotting of the presence or absence of growth in materials and media are all known and included in microbial testing methods (CDER 2015). These methods are grouped into either qualitative methods that demonstrate the presence or absence of the target microorganism, directly or indirectly in a defined quantity of test material, or quantitative methods that identifies the number of microorganisms available through direct enumeration (colony forming units) or indirectly (most probable number counts, color absorbance, impedance) in a standard quantity of material (Wills 2000, NordVal 2009, Eurachem 2013). Some qualitative microbiological test methods, such as where the result is expressed in terms of detected/not detected and confirmation and identification procedures, should be confirmed by

determining, where suitable, the specificity, relative exactitude, positive and negative deviations, limit of detection, matrix effect, repeatability and reproductivity. In the case of quantitative microbiological test methods, specificity, sensitivity, relative acuteness, positive and negative deviations, repeatability, reproducibility and the challenges of determination within the framework of a defined variability should be considered and, if required, quantitatively determined (ISO/IEC 17025:2005, ISO 7218:2007).

With the use of a reference method, demonstration should be made in laboratory for its competence to determine if it meets the performance characteristics prescribed both, in the national and international standards. Microbiological researches could be done using optional (rapid) methods like immunological, molecular biological or instrumental. The authentication of these methods takes into account the assessment of their equality to the corresponding reference method. When it comes to microbiology, using correct quality controls is very important, since the translation of the performance characteristic to microbiological examination is not normally guaranteed and depends on the test matrix. Validating microbiological methods should not be based on the same principle as in chemical methods (Golcteger 2001, ISO 16140:2003). The actual test conditions should be reflected on by the test methods when validating the microbiological test. Achievement could be attended applying purely natural contaminated products or products mixed with a predetermined level of contaminating organisms (Wills 2000, Sartory 2005, AOAC 2006). Matrix differences should be considered when testing various types of samples. Appropriate statistical methods should be used when validating the results (Wills 2000). In the case of the modification of a version, a method is needed just as in the original method and requires comparisons, using the replicates to ensure that this is the case (Eurachem 2013). Statistical validity must be adhered to experimental design and analysis of the results (Wills 2000). Even on the completion of validation, an operator will still have to verify regularly that the documented performance can be reached, e.g. using spiked samples or reference materials involving the relevant matrices (NordVal 2009, ISO/IEC 17025:2005). Laboratories should be able to show that the method is performing in their laboratory environment (Nolard & Chasseur 2004). They need to keep documented evidence that the method is performing as expected, and that a decision has been made by the laboratory to accept the performance. Method information given by method validation on specification of performance is not only on the recovery and enumeration of the target organism(s), but is also for the analytical requirements of the method in practice (e.g. incubation temperature and time, media preparation and storage conditions and sample storage or afore-treatment) (Kromidas 2000). Recovery efficiency is attached to the main information, upper and lower working (detection) bounds, selectivity and specificity (inaccurate-positive and negatives), counting uncertainty

(methodological and analyst) and a general appropriation of precision. As the data is to give the first assessment of performance of a new or altered method, it is highly emphasized that analysts with good experience in microbiological methods carry out the work (COFRAC 2004). The basic parameters for a bio-analytical method authentication are accuracy, precision, selectivity, reproducibility, stability, sensitivity, repeatability, limit of detection and of quantification.

Accuracy: The exactitude of an analytical method explains how close the mean test results obtained are to the real value of the analyte (CDER 2015). The replicate analysis of samples containing known amounts of the analyte determines the accuracy (Riley 2003, USPC 2003). As the results expected are normally centered on the existing method, it is essential to test the accuracy by making a comparison between the old and new methods (PDA 2000, MAF 2002). Spiking trials are normally applied to get accuracy data. The average and standard deviation of a number of repeated tests with spiked materials must be obtained and comparison made with the characterized value for the material used as the reference. When making spike trials, spike addition should be made early in the analysis to enable that extraction efficiency is included in the results (FAO 1999, Thompson *et al.* 2002). When reference material is not available for spiking trials, the parameter is difficult to assess. Accuracy can also be established for stuffs with different matrices (Kromidas 2000). Even if it is one, a pure reference culture under the expected environmental terms should be applied and the test method findings should be compared with a reference or standard method (ISO/IEC 17025:2005, Kromidas 2000).

Precision: Analytical precision method explains the closeness of individual measures of an analyte when the procedure is done again and again on various aliquots with a homogeneous volume of biological matrix (CDER 2015). Precision is very much important as an identification method because trending isolates can be hard if the same organism is given different identities at each time it is isolated (PDA 2000, Eurachem 2014).

Repeatability: Repeatability must be calculated when authenticating a method being a measure of agreement of replicate tests carried out on the same material in the same laboratory by the analysts (MAF 2002, Eurachem 2014).

Reproducibility: Reproducibility must also be calculated during validation and is a test to prove its agreement with the tests done by other laboratories. Generally, the expectation is that within a laboratory, variabilities would be less among laboratories variations. Under one laboratory confirmation studies, reproducibility could be a measure to test the agreement among tests done in different days by different experts (MAF 2002, Eurachem 2014).

Selectivity/Specificity: This is the capability of an analytical proof to verify and quantify the analytes among other components in the sample. In the case of selectivity,

analyses of virgin samples of the exact biological material must be obtained from not less than six sources. Each and every one of the blank sample must be tested for interference and selectivity made to ensure the lower limit of quantification (MAF 2002, Eurachem 2014).

Sensitivity: Sensitivity of the test method should be made and can be explained as the limit of accurate measurement. This is to show the limit that a method can be discriminated, with a large measure of trust, between and above levels below several critical values close to zero. Sensitivity is the effectiveness of the gradient response curve or the change in instrument response to correspond with the change in analyte concentration (FAO 2001, MAF 2002, Eurachem 2014).

Stability: Procedures have to measure the stability of the analytes when collecting and handling samples, after long and (frozen at the intended storage temperature) short-term (bench top, room temperature) storage, and going through freezing and thawing cycles along with the analytical processes. The terms applied in stability trials must reflect conditions supposedly to be met during the real material-handling and analysis. The processes must also take into account the assessment of analyte stability in stock solution (CDER 2015).

References

1. AOAC, 2006. *Presidential Task Force on Best Practice for Microbiological Methodology*, US FDA, Appendix G-STWG Executive Summary 7-16-06 7-16-06: 1-5.
2. CDER (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine (CVM)), 2015. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecompliance/regulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>, (Date accessed: 15 June 2016).
3. COFRAC (French Committee for Accreditation), 2004. Guidelines for Method Validation in Medical Biology, Document LAB GTA (04), <https://www.cofrac.fr/en/activites/laboratoires.php>. (Date accessed: 12 June 2016).
4. EA (European co-operation for Accreditation), 2012. The Scope of Accreditation and Consideration of Methods and Criteria for the Assessment of the Scope in Testing, EA-2/05, Publication Reference, 13 pp.
5. Elder, B.L., Hansen, S.A., Kellogg, J.A., 1997. CUMITECH 31: verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Washington DC: American Society for Microbiology.
6. Eurachem, 2013. Accreditation for Microbiological Laboratories, Eurachem Guide, 32 pp.
7. Eurachem, 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Eurachem Guide, 70 pp.
8. FAO, Joint FAO/IAEA Expert Consultation, 1999. Guidelines for Single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals.
9. FAO, Joint FAO/WHO, 2001. Proposed guidelines and working instructions to aid the implementation of the criteria approach to the selection of methods of analysis for codex purposes, Food Standard Programme, Report on the twenty-third session of the Codex Committee on the methods of analysis and sampling, Alinorm 01/23.
10. Garfield, F., Klesta, E. & Hirsch, J. 2000. *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories*. AOAC International, Third Edition, USA, 113-129.
11. Golcteger, S. 2001. Microbiological examination and proficiency testing in dairy laboratories. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, (52): 61-67.
12. Green, M. 1996. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*, (68): 305A-309A.
13. ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods, http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=30158. (Date accessed: 12 June 2016).
14. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=39883. (Date accessed: 15 June 2016).
15. ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations,

Limit of Detection/Limit of Quantification: This is the minimum amount of organisms which can be identified and counted. The limit of detection is especially necessary in the case of qualitative tests as in sterility which must be able to identify a single viable organism. Nonetheless, practically testing this ability is not easy because of problems associated with preparing a sample which have only one viable organism. When a sample with less numbers of organisms are used (e.g., 1-10 CFU), it should be enough to assess the limit of detection (PDA 2000, Riley 2003, USPC 2003).

Conclusions

A validation method could be defined as an arrangement of procedures and the documentation setting out test performance characteristics. It is therefore, these performance characteristics or the validation parameters of the method which establish its appropriateness for the purpose it was meant for. The characteristics and parameters, spell out what this method could achieve in an optimized laboratory conditions of solution texture, instrumental settings, analyte isolation, including the other features in which such an experiment is done. Bringing in certain validation parameters in any validation agreement is guided by its usage, samples test and the aim of this method, taking cognizance of both the local and the international rules and regulations in play.

- <http://www.iso.org/iso/home>. (Date accessed: 15 June 2016).
16. Kromidas, S., 2000. Handbook of validation in analysis, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 3-527-29811-8.
 17. MAF (Food Assurance Authority), 2002. A guide for the validation and approval of new marine biotoxin test methods, Shellfish Quality Assurance Programme, A Guide to the Validation of New Test Methods, Seafood Industry Agreed Guidelines Issue 1: P2. Wellington, 1-22.
 18. McCully, K.A. & Lee, J.G. 1980. Optimizing Chemical Laboratory Performance Through the Application of Quality Assurance Principle, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 73 pp.
 19. NELAC, 2007. Microbiological Testing, Draft Interim Standard, Vol 1, Module 5, www.nelac-institute.org, (Date accessed: 12 June 2016).
 20. Nolard, N. & Chasseur, C. 2004. Validation of microbiological and chemical inspections for the workplaces, Programmes PS 50/47 and PS/50/48: final report, 1-93.
 21. NordVal, 2009. Food microbiology protocol for the validation of alternative methods, <http://www.nmkl.org/dokumenter/nordval/NordValProtocol.pdf>. (Date accessed: 15 June 2016).
 22. PDA, 2000. Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods, Technical Report No. 33, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Supplement TR33, 54 (3).
 23. Riley, B.S. 2003. Rapid microbiology methods in the pharmaceutical industry, American Pharmaceutical Review, The Review of American Pharmaceutical Business and Technology, <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/113094-Rapid-Microbiology-Methods-in-the-Pharmaceutical-Industry/>, (Date accessed: 22 November 2016).
 24. Sartory, D.P. 2005. Validation, verification and comparison: Adopting new methods in water microbiology. *Water SA*, 31 (3): 393-396.
 25. Thompson, M., Ellison, S.L.R. & Wood, R. 2002. Harmonised guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, (74): 835-855.
 26. USPC Inc., 2003. *Microbial limits tests*. USP 26, Rockville, MD, 2006 pp.
 27. White, V.R., Alderman, D.F. & Fasion, C.D. 2001. *Procedures and General Requirements, National Voluntary Laboratory Accreditation Program Office of Standards Services Technology Services*, NIST Handbook 150, 60p.
 28. Wills, K., 2000. *Evaluation, Validation of Implementation of New Microbiological Testing Methods, A Brief Review of the Highlight of PDA Technical Report No.33*, Celsis Ltd, UK.

Trakya University Journal of Natural Sciences

Telif Hakları Devretme Formu

Eserin Adı :

Eserin Cinsi :

Yukarıda belirtilen, baskı ve yayın hakkını Trakya Üniversitesi'ne devrettiğim ve basım işlerinin Üniversiteler Yayın Yönetmeliği ve Trakya Üniversitesi Yayın Uygulama Yönergesi hükümleri gereğince yapılmasını kabul ettiğim eserimin telif hakkından feraget ettiğimi, buna ilişkin mali haklarımı Trakya Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

Adı, Soyadı :

Ünvanı :

İmza :

Tarih :

Trakya University Journal of Natural Sciences

Copyright Release Form

Title of the Article :

Type of the Article :

Please read the notes, fill complete, sign and send this form to the Journal Editor. We transferred copyright of below article to the Trakya University (Edirne - Turkey). The material presented in the article has not been published or submitted elsewhere. I am aware of manuscript submission in its present form. Additionally, data collection has been done under all legal requirements. We accepted the conditions of publication below the article. I (we) agree that the above conditions of publication form.

Name and the surname of the author(s) :

Title of the author(s) :

Address of the author(s) :

Signature :

Date :

Yazım Kuralları

Trakya University Journal of Natural Sciences

(Trakya Univ J Nat Sci)

Trakya University Journal of Natural Sciences, her yıl Haziran ve Aralık aylarında olmak üzere yılda iki sayı olarak çıkar ve **Biyoloji, Biyoteknoloji, Çevre Bilimleri, Biyokimya, Biyofizik, Su Ürünleri, Ziraat, Veterinerlik, Ormancılık, Hayvancılık, Genetik, Gıda, Temel Tıp Bilimleri** alanlarındaki teorik ve deneysel makaleleri yayınlar. Dergide makaleler Türkçe ve İngilizce olarak yayınlanabilir. Ancak, makale İngilizce yazılmış ise Türkçe özet, Türkçe yazılmış ise geniş İngilizce özet olmalıdır. Özet kısmında kısaca giriş, materyal ve metot, sonuçlar ve tartışma başlıkları yer almalıdır. Dergide orijinal çalışma, araştırma notu, derleme, teknik not, editöre mektup, kitap tanıtımı yayınlanabilir. Makalelerin başlıkları Türkçe ve İngilizce olarak yazılır. Değerlendirilmek üzere dergiye gönderilen makalelerin yazımında ulusal ve uluslararası geçerli etik kurallara uyularak araştırma ve yayın etiğine dikkat edilmesi gerekmektedir. Makalelerine konu olarak seçilen deney hayvanları için etik kurul onayı alınmış olmalı ve makalenin sunumu esnasında dergi sistemine ek dosya olarak eklenerek belgelendirilmelidir. Basılacak eserlerin daha önce hiçbir yerde yayınlanmamış ve yayın haklarının verilmemiş olması gerekir. Dergide yayınlanacak yazıların her türlü sorumluluğu yazar(lar)ına aittir.

Makalelerin sunulması

Makaleler <http://dergipark.gov.tr/trkinat> web adresi üzerinden gönderilmelidir. Dergiye makale gönderimi mutlaka online olarak yapılmalıdır.

Makale gönderiminde daha önce Dergi Park sistemine giriş yapmış olan kullanıcılar, üye girişinden kullanıcı adı ve şifreleri ile giriş yapabilirler.

Makale gönderiminde sisteme ilk kez giriş yapacak ve makale gönderecek yazarlar **"GİRİŞ"** bölümünden **"KAYDOL"** butonunu kullanacaklardır.

Yazarlar dergipark sistemine kaydolduktan sonra **"YAZAR"** bölümünden girecek ve makaleyi sisteme, yönergelere uygun olarak yükleyeceklerdir.

Eser hazırlama ilkeleri

Eserler, Yayın Komisyonu'na **MS Word** kelime işlemcisiyle **12 punto** büyüklüğündeki **Times New Roman** tipi yazı karakteriyle ve 1,5 aralıklı yazılmış olarak gönderilmelidir. İletişim bilgileri makalenin ilk sayfasında tek başına yazılmalı, daha sonraki sayfada yazar isimleri ve iletişim bilgileri bulunmamalıdır. Tüm makale her sayfası kendi arasında **satır numaraları** içerecek şekilde numaralandırılmalıdır. Yazar adları yazılırken herhangi bir akademik unvan belirtilmemelidir. Çalışma herhangi bir kurumun desteği ile yapılmış ise, teşekkür kısmında kurumun; kişilerin desteğini almış ise kişilerin bu çalışmayı desteklediği yazılmalıdır.

Makale aşağıdaki sıraya göre düzenlenmelidir:

Yazarlar: Makalenin ilk sayfasında sadece yazar isimleri ve adresleri bulunmalıdır. Adlar kısaltmasız, soyadlar büyük harfle ve ortalanarak yazılmalıdır. Adres(ler) tam yazılmalı, kısaltma kullanılmamalıdır. Birden fazla yazarlı çalışmalarda, yazışmaların hangi yazarla yapılacağı yazar ismi altı çizilerek belirtilmeli (sorumlu yazar) ve **yazışma yapılacak yazarın adres ve e-posta adresi yazar isimlerinin hemen altına yazılmalıdır. Bu sayfaya makale ile ilgili başka bir bilgi yazılmamalıdır. Makale, takip eden sayfada bulunmalı ve yazar-iletişim bilgisi içermemelidir.**

Başlık: Kısa ve açıklayıcı olmalı, büyük harfle ve ortalanarak yazılmalıdır. Türkçe makalelerde İngilizce özetin üzerine İngilizce başlık, İngilizce makalelerde Türkçe özetin üzerine Türkçe başlık yazılmalıdır.

Özet ve Anahtar kelimeler: Türkçe ve İngilizce özet 250 kelimeyi geçmemelidir. Özetin altına küçük harflerle anahtar kelimeler ibaresi yazılmalı ve yanına anahtar kelimeler virgül konularak sıralanmalıdır. Anahtar kelimeler, zorunlu olmadıkça başlıktakilerin tekrarı olmamalıdır. İngilizce özet koyu harflerle "Abstract" sözcüğü ile başlanmalı ve İngilizce başlık, İngilizce özetin üstüne büyük harflerle ortalanarak yazılmalıdır. Makaledeki ana başlıklar ve varsa alt başlıklara **numara verilmemelidir.**

Giriş: Çalışmanın amacı ve geçmişte yapılan çalışmalar bu kısımda belirtilmelidir. Makalelerde SI (Système International) birimleri ve kısaltmaları kullanılmalıdır. Diğer kısaltmalar kullanıldığında, metinde ilk geçtiği yerde 1 kez açıklanmalıdır. Kısaltma yapılmış birimler ile rakamlar arasında boşluk bulunmamalı ve kısaltma sonuna nokta konmamalıdır (45m mesafe tespit edilmiştir). Kısaltma cümle sonunda ise nokta konmalıdır (... tespit edilen mesafe 45m. Dolayısıyla...).

Materyal ve Metod: Eğer çalışma deneysel ise kullanılan deneysel yöntemler detaylı ve açıklayıcı bir biçimde verilmelidir. Makalede kullanılan metod/metodlar, başkaları tarafından tekrarlanabilecek şekilde açıklayıcı olmalıdır. Fakat kullanılan deneysel yöntem herkes tarafından bilinen bir yöntem ise ayrıntılı açıklamaya gerek olmayıp sadece yöntemin adı verilmeli veya yöntemin ilk kullanıldığı çalışmaya atıf yapılmalıdır.

Sonuçlar: Bu bölümde elde edilen sonuçlar verilmeli, yorum yapılmamalıdır. Sonuçlar gerekirse tablo, şekil ve grafiklerle de desteklenerek açıklanabilir.

Tartışma: Sonuçlar mutlaka tartışılmalı fakat gereksiz tekrarlardan kaçınılmalıdır. Bu kısımda, literatür bilgileri vermekten çok, çalışmanın sonuçlarına yoğunlaşmalı, sonuçların daha önce yapılmış araştırmalarla benzerlik ve farklılıkları verilmeli, bunların muhtemel nedenleri tartışılmalıdır. Bu bölümde, elde edilen sonuçların bilime katkısı ve önemine de mümkün olduğu kadar yer verilmelidir.

Teşekkür: Mümkün olduğunca kısa olmalıdır. Teşekkür, genellikle çalışmaya maddi destek sağlayan kurumlara, kişilere veya makale yayına gönderilmeden önce inceleyip önerilerde bulunan uzmanlara yapılır. Teşekkür bölümü kaynaklardan önce ve ayrı bir başlık altında yapılır.

Kaynaklar: Yayınlanmamış bilgiler kaynak olarak verilmemelidir (*Yayınlanmamış kaynaklara örnekler: Hazırlanmakta olan veya yayına gönderilen makaleler, yayınlanmamış bilgiler veya gözlemler, kişilerle görüşülerek elde edilen bilgiler, raporlar, ders notları, seminerler gibi*). Ancak, tamamlanmış ve jüriden geçmiş tezler ve DOI numarası olan makaleler kaynak olarak verilebilir. Kaynaklar, makale sonunda alfabetik sırada (yazarların soyadlarına göre) sıra numarası ile belirtilerek verilmelidir.

Makale ve kitapların referans olarak veriliş şekilleri aşağıdaki gibidir:

Makale: Yazarın soyadı, adının baş harfi, basıldığı yıl. Makalenin başlığı, *derginin adı*, cilt numarası, sayı, sayfa numarası. Dergi adı italik yazılır.

Örnek:

Tek yazarlı Makale için

Soyadı, A. Yıl. Makalenin adı. (Sözcüklerin ilk harfi küçük). *Yayınlandığı derginin açık ve tam adı*, Cilt(Sayı): Sayfa aralığı.

Kıvan, M. 1998. *Eurygaster integriceps* Put. (Heteroptera: Scutelleridae)'nin yumurta parazitoiti *Trissolcus semistriatus* Nees (Hymenoptera: Scelionidae)'un biyolojisi üzerinde araştırmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 22(4): 243-257.

İki ya da daha çok yazarlı makale için

Soyadı1, A1. & Soyadı2, A2. Yıl. Makalenin adı. (Sözcüklerin ilk harfi küçük). *Yayınlandığı derginin tam adı*, Cilt(Sayı): Sayfa aralığı.

Lodos, N. & Önder, F. 1979. Contribution to the study on the Turkish Pentatomoidea (Heteroptera) IV. Family: Acanthosomatidae Stal 1864. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 3(3): 139-160.

Soyadı1, A1., Soyadı2, A2. & Soyadı3, A3. Yıl. Makalenin adı. (Sözcüklerin ilk harfi küçük). *Yayınlandığı derginin tam adı*, Cilt (Sayı): Sayfa aralığı.

Önder, F., Ünal, A. & Ünal, E. 1981. Heteroptera fauna collected by light traps in some districts of Northwestern part of Anatolia. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 5(3): 151-169.

Kitap: Yazarın soyadı, adının baş harfi, basıldığı yıl. Kitabın adı (varsa derleyen veya çeviren ya da editör), cilt numarası, baskı numarası, basımevi, basıldığı şehir, toplam sayfa sayısı.

Örnek:

Soyadı, A., Yıl. *Kitabın adı*. (Sözcüklerin ilk harfi büyük, italik). Basımevi, basıldığı şehir, toplam sayfa sayısı s./pp.

Önder F., Karsavuran, Y., Tezcan, S. & Fent, M. 2006. *Türkiye Heteroptera (Insecta) Kataloğu*. Meta Basım Matbaacılık, İzmir, 164 s.

Lodos, N., Önder, F., Pehlivan, E., Atalay, R., Erkin, E., Karsavuran, Y., Tezcan, S. & Aksoy, S. 1999. *Faunistic Studies on Lygaeidae (Heteroptera) of Western Black Sea, Central Anatolia and Mediterranean Regions of Turkey*. Ege University, İzmir, ix + 58 pp.

Kitapta Bölüm: Yazarın soyadı, adının baş harfi basıldığı yıl. Bölüm adı, sayfa numaraları. Parantez içinde: Kitabın editörü/editörleri, *kitabın adı*, yayınlayan şirket veya kurum, yayınlandığı yer, toplam sayfa sayısı.

Örnek:

Soyadı, A., Yıl. Bölüm adı, sayfa aralığı. In: (editör/editörler). *Kitabın adı*. (Sözcüklerin ilk harfi büyük, italik). Basımevi, basıldığı şehir, toplam sayfa sayısı s./pp.

Jansson, A. 1995. Family Corixidae Leach, 1815—The water boatmen. Pp. 26–56. In: Aukema, B. & Rieger, Ch. (eds) Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Vol. 1. Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Nepomorpha, Gerromorpha and Leptopodomorpha. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, xxvi + 222 pp.

Kongre, Sempozyum: Yazarlar, Yıl. "Bildirinin adı (Sözcüklerin ilk harfi küçük), sayfa aralığı". Kongre/Sempozyum Adı (Tarihi (gün aralığı ve ay), Toplantı Yeri) Bildirileri, (varsa) Yayınlayan Kurum, toplam sayfa sayısı s./pp.

Örnek:

Önder, F., Karsavuran, Y., Pehlivan, E. & Turanlı, F. 1995. Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) uygulama alanında saptanan Pentatomoidea (Heteroptera) türleriyle ilgili bir değerlendirme. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, 27-29 Nisan, Şanlıurfa, 120-130.

İnternet: Eğer bir bilgi herhangi bir internet sayfasından alınmış ise (*internetten alınan ve dergilerde yayınlanan makaleler hariç*), kaynaklar bölümüne internet sitesinin ismi tam olarak yazılmalı, siteye erişim tarihi verilmelidir.

Soyadı, A., Yıl. Çalışmanın adı. (Sözcüklerin ilk harfi küçük). (web sayfası) <http://www.....>. (Erişim tarihi: Mayıs 2009).

Hatch, S., 2001. Studentsperception of online education. Multimedia CBT Systems. <http://www.scu.edu.au/schools/sawd/moconf/papers2001/hatch.pdf> (Erişim: May 2009).

Kaynaklara metin içinde numara verilmemeli ve aşağıdaki örneklerde olduğu gibi belirtilmelidir.

Örnekler:

... x maddesi atmosferde kirliliğe neden olmaktadır (Landen 2002). Landen (2002) x maddesinin atmosferde kirliliğe neden olduğunu belirtmiştir. İki yazarlı bir çalışma kaynak olarak verilecekse, (Landen ve Bruce 2002) veya Landen ve Bruce (2002)'ye göre. ... şeklinde olmuştur; diye verilmelidir. Üç veya daha fazla yazar söz konusu ise, (Landen ve ark. 2002) veya Landen ve ark. (2002)'ye göre olduğu gösterilmiştir; diye yazılmalıdır.

Şekil ve Tablolar: Tablo dışında kalan fotoğraf, resim, çizim ve grafik gibi göstermeler "Şekil" olarak verilmelidir. Resim, şekil ve grafikler, net ve ofset baskı tekniğine uygun olmalıdır. Her tablo ve şeklin metin içindeki yerlerine konmalıdır. Tüm tablo ve şekiller makale boyunca sırayla numaralandırılmalı (Tablo 1., Şekil. 1), başlık ve açıklamalar içermelidir. Şekillerin sıra numaraları ve başlıkları, alta, tabloların ki ise üstlerine yazılır.

Şekiller (tablo dışında kalan fotoğraf, resim, çizim ve grafik gibi) tek tek dosyalar halinde en az **300 dpi** çözünürlükte ve **tif** dosyası olarak şekil numaraları dosya isminde belirtilmiş şekilde ayrıca sisteme ek dosya olarak yüklenmelidir.

Sunulan makaleler, öncelikle Dergi Yayın Kurulu tarafından ön incelemeye tabii tutulur. **Dergi Yayın Kurulu, yayınlanabilecek nitelikte bulmadığı veya yazım kurallarına uygun hazırlanmayan makaleleri hakemlere göndermeden red kararı verme hakkına sahiptir.** Değerlendirmeye alınabilecek olan makaleler, incelenmek üzere iki ayrı hakeme gönderilir. Dergi Yayın Kurulu, hakem raporlarını dikkate alarak makalelerin yayınlanmak üzere kabul edilip edilmemesine karar verir.

Editör : Doç. Dr. Kadri KIRAN

Trakya Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balkan Yerleşkesi
22030 - EDİRNE

Tel : 0284 235 82 30
Fax : 0284 235 82 37
e-mail : tujns@trakya.edu.tr

Author Guidelines

Trakya University Journal of Natural Sciences (Trakya Univ J Nat Sci)

Trakya University Journal of Natural Sciences, is published twice a year in June and in December and includes theoretical and experimental articles in the field of **Biology, Biotechnology, Environmental Sciences, Biochemistry, Biophysics, Fisheries Sciences, Agriculture, Veterinary and Animal Sciences, Forestry, Genetics, Food Sciences** and **Basic Medicine Sciences**. Articles in the journal can be published either in Turkish or English. On the other hand, if an article is written in English, it should include an abstract in Turkish, and if written in Turkish, it should include a detailed abstract written in English. Abstracts should include an introduction, material and methods, results and discussion sections in summary. Original studies, research notes, reviews, technical note, letters to the Editor and book reviews can be published in the journal. Heading of the articles should be written both in English and Turkish. The authors should pay attention to research and publication ethics in preparation of their manuscripts before submission by considering national and international valid ethics. An approval of Ethics and Animal Welfare Committee is mandatory for submissions based on experimental animals and this approval should be provided during submission of the manuscripts. Articles which have not been published elsewhere previously and whose copyright has not been given to anywhere else should be submitted. All responsibilities related to published articles in Trakya University Journal of Natural Sciences belong to the authors.

Submitting articles

Articles should be submitted on the web through <http://dergipark.gov.tr/trkinat> and all submissions should be performed online.

Authors, who are already a member of the DergiPark system, can enter in the login section using their "user name" and "password" to submit their articles.

Authors entering the DergiPark system for the first time to submit an article will enter in the "**REGISTER**" section to submit their articles.

Article preparation rules

Articles should be submitted to the Journal using **MS Word** preparing **12 points Times New Roman** font and 1.5 row spacing. Author names and contact info must be in first page, article must continue in second page without author names and contact info. Whole article should have numbered with **line number** restarting each page. The author's name must not be specified any academic titles. If studies supported by a foundation, this support should have been written in the acknowledgement section.

Articles should be arranged as below:

Authors: The name(s) of the author(s) should not be abbreviated and must be written under the title one by one, with surnames in capital letters. Address(es) should be written in full. Corresponding authors in multiple authored submissions should be indicated, and the address and e-mail of the corresponding author should be written just under the author(s) list. **No other information about the manuscript should be included in this page. The main manuscript text should start with the following new page and should not include any author-contact information.**

Title: Should be short and explanatory and written in capital letters and centered.

Abstract and keywords: Turkish and English abstracts should not exceed 250 words. "Keywords" should be written under the abstract in small letters and all keywords should be written using a comma after all. Keywords should not be replica of the title words, if it is not obligatory. Abstract should begin "Abstract" word from the left side of the page, and if the article is written in Turkish, the English title should be written above the English Abstract. The main and sub headers (if present) should not be numbered.

Introduction: The aim of the submitted and history of the previous studies should be indicated in this section. SI (Systeme International) system and abbreviation should be used in the article. Other abbreviations- should be explained once in their first appearance in the text. No space should be left between the abbreviations and the preceding numerical values and no "." sign should be used after abbreviations except those used at the end of a sentence (...the determined distance is 45m. Therefore, ...).

Material and Method: If the submitted study is experimental, methods of the experiments should be given in detail. The method(s) used in the article should be descriptive for others to repeat. If a widely known experimental method is used, the method does not need to be explained in detail. In this situation, indicating only the name of the experimental method or citing the study who used the method for the first time will be enough.

Results: Obtained results should be given in this section without any comment. Results can be explained with tables, figures or graphics, if necessary.

Discussion: Results must be discussed, but unnecessary duplications should be avoided. In this section, rather than giving literature data, authors should focus on their results considering similarities and differences with and between previously conducted researches, and should discuss possible reasons of similarities and differences. The contribution to science and importance of the obtained results should also be mentioned as much as possible in this section.

Acknowledgements: Should be as short as possible. Thanks are usually made to institutions or individuals who support the study or to experts who reviewed the article before submitting to the journal. Acknowledgement section should be given before the references section in a separate header.

References: Unpublished information should not be given as a reference (examples of unpublished references: articles in preparation or submitted somewhere, unpublished data or observations, data obtained based on interviews with individuals, reports, lecture notes, seminars, etc.). However, thesis completed and signed by a jury and articles with DOI numbers given can be used as reference. References should be given at the end of the text, sorted alphabetically by author's surname and should be given with numbering.

Articles and books as a reference forms are as follows:

Articles: Surname of author, first letter of author's first name, publication year, article title, the *name of the journal*, volume, issue, page numbers. Journal name is written in italics.

Example:

Articles with single author

Surname, N. Year. Article title (First letter of all words small). *Whole name of journal*, Volume (Issue): page range.

Kivan, M. 1998. *Eurygaster integriceps* Put. (Heteroptera: Scutelleridae)'nin yumurta parazitoiti *Trissolcus semistriatus* Nees (Hymenoptera: Scelionidae)'un biyolojisi üzerinde araştırmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 22(4): 243-257.

Articles with two or more authors

Surname1, N1. & Surname2, N2. Year. Article title (first letter of all words small). *Whole name of journal*, Volume (Issue): page range.

Lodos, N. & Önder, F. 1979. Contribution to the study on the Turkish Pentatomoidea (Heteroptera) IV. Family: Acanthasomatidae Stal 1864. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 3(3): 139-160.

Surname1, N1., Surname2, N2. & Surname3, N. Year. Article title (First letter of words small). *Whole name of journal*, Volume (Issue): page range.

Önder, F., Ünal, A. & Ünal, E. 1981. Heteroptera fauna collected by light traps in some districts of north western part of Anatolia. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 5(3): 151-169.

Book: Surname of author, first letter of author's first name, Year. *Book title* (name of translator or book editor if present), volume, edition number, press, city, page number.

Example:

Surname, N. Year. *Book Title* (First letter of words small and italic), volume, edition number, press, city, page number.

Önder, F., Karsavuran, Y., Tezcan S. & Fent, M. 2006. *Türkiye Heteroptera (Insecta) Kataloğu*. Meta Basım Matbaacılık, İzmir, 164 s.

Lodos, N., Önder, F., Pehlivan, E., Atalay, R., Erkin, E., Karsavuran, Y., Tezcan, S. & Aksoy, S. 1999. *Faunistic studies on Lygaeidae (Heteroptera) of Western Black Sea, Central Anatolia and Mediterranean Regions of Turkey*. Ege University, İzmir, ix + 58 pp.

Book Section: Surname of author, first letter of the author's first name, Year. Section name, page range. In: (Editor of Book, *Book title*, press, city, page number).

Example:

Surname, N. Year. Section name, page range. In: (Editor of Book, *Book title* (First letter of words small and italic), press, city, page number)

Jansson, A. 1995. Family Corixidae Leach, 1815—The water boatmen. Pp. 26–56. In: Aukema, B. & Rieger, Ch. (eds) Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Vol. 1. Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Nepomorpha, Gerromorpha and Leptopodomorpha. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, xxvi + 222 pp.

Congress, Symposium: Surname, N. Year. "Presentation title (first letters of all words small), page range". Name of Congress/Symposium (Date -day range and month, place), page number.

Example:

Önder, F., Karsavuran, Y., Pehlivan E. & Turanlı, F. 1995. Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) uygulama alanında saptanan Pentatomoidea (Heteroptera) türleriyle ilgili bir değerlendirme. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, 27-29 Nisan, Şanlıurfa, 120-130.

Internet: If any information is taken from an internet source (articles published in journals and taken from internet excluded), internet address should be written in full in references section and access date should be indicated.

Surname, N. Year. Name of study (First letter of words small). (Web page: <http://www.....>). (Date accessed: May 2009).

Hatch, S. 2001. Student perception of online education. Multimedia CBT Systems. <http://www.scu.edu.au/schools/sawd/moconf/papers2001/hatch.pdf> (Date accessed: May 2009).

References within the text should not be numbered and indicated as in the following examples.

Examples:

... atmospheric pollution is causing by x matter (Landen 2002). If an article has two authors, it should be indicated in the text as (Landen and Bruce 2002) or ... according to Landen and Bruce (2002) If there are three or more authors, references should be indicated as (Landen et al. 2002) or according to Landen et al. 2002 ...

Graphics and tables: All photos, pictures, drawings and graphics except tables should be indicated as Figures. Pictures, figures and graphics should be clear and ready to print with offset technique. The places of all tables and figures should be indicated in the text. All tables and figures should be numbered within the text respectively (Table 1, Fig. 1). Figure numbers and legends are written below the figures, table numbers and legends are written above the tables.

All figures (all pictures, drawings and graphics except table) should also be uploaded to the system separately with 300dpi resolution at least as .tif file using the figure numbers in the files name.

Submitted articles are subjected to prior review by the Editorial Board. Editorial Board has the right to reject the articles which are considered of low quality for publish or those which are insufficiently prepared according to the author guidelines. The articles accepted for consideration for evaluation will be sent to two different referees. Editorial Board decides to accept or reject the submissions for publication by taking into account the reports of referees.

Editor : Dr. Kadri KIRAN

Trakya Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balkan Yerleşkesi
22030 - EDİRNE-TURKEY

Phone : +90 284 235 82 30
Fax : +90 284 235 82 37
e-mail : tujns@trakya.edu.tr

