



EJBCS

**Eurasian Journal of
Biological and Chemical Sciences
(Eurasian J. Bio. Chem. Sci.)**

Cilt:2 Volume: 2 Year: 2019

e-ISSN 2651-5237



EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Cilt: 2 Volume: 2 Year: 2019

Published Biannually

Corresponding Address

Gaziantep University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Gaziantep, Turkey

E-mail: eurasianbiochemjournal@gmail.com / mtdogan1@gmail.com

Web: <http://dergipark.org.tr/ejbc>

Editor in Chief

Assoc. Prof. Dr. Muhittin DOĞAN

Editor (Associate)

Dr. Muhammet DOĞAN

Editorial Board

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ

Prof. Dr. Anna PEKSA

Prof. Dr. Elif LOLOĞLU

Prof. Dr. Elif ÖZTETİK

Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

Prof. Dr. Issa SHARİFPOUR

Prof. Dr. İsmet YILMAZ

Prof. Dr. Osman GÜLNAZ

Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR

Prof. Dr. Vladimer TSITSISHVILI

Prof. Dr. Zeliha SELAMOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Erol ATAY

Assoc. Prof. Dr. Gökhan NUR

Assoc. Prof. Dr. H. Ahmet DEVECİ

Assoc. Prof. Dr. Şenay UĞUR

Assoc. Prof. Dr. Utku AVCI

Dr. Ardalan PASDARAN

Dr. Eva URGEOVÁ

Dr. Mustafa PEHLİVAN

Hatay Mustafa Kemal University, Turkey

Wrocław University, Poland

Gazi University, Turkey

Eskisehir Technical University, Turkey

İnönü University, Turkey

Iranian Fisheries Research Organization, Iran

İnönü University, Turkey

Cukurova University, Turkey

Adnan Menderes University, Turkey

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia

Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey

Hatay Mustafa Kemal University, Turkey

Gaziantep University, Turkey

Gaziantep University, Turkey

Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey

Recep Tayyip Erdoğan University, Turkey

Shiraz University, Iran.

The University of St. Cyril and Methodius of Trnava, Slovakia

Gaziantep University, Turkey

Language Editor

Gaziantep University, Turkey

Technical Editor

Dr. Mustafa SEVİNDİK

Owner / Publisher

Dr. Muhammet DOĞAN

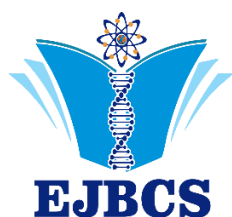
This journal is peer-reviewed and published twice (June, December) a year.

All responsibility of the articles belongs to the authors.



Contents / İçindekiler

Method validation for the determination of toxic elements in fizzy fruity mineral water drinks using ICP-MS	38-41
<i>Serpil Kılıç, Murat Kılıç</i>	
Van kedilerinde total beyin hacminin bilgisayarlı tomografi görüntüleri kullanılarak hesaplanması	42-46
<i>Osman Yılmaz, Taylan Tuğrul</i>	
Thermal kinetics and thermodynamics of the dehydration reaction of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$..	47-51
<i>Fatma Tuğçe Şenberber, Emek Möröydor Derun</i>	
Glucose effect on biofilm formations of <i>S. aureus</i> strains	52-55
<i>Meltem Yesilcimen Akbas, Taner Sar</i>	
Single cell level microalgal green synthesis of silver nanoparticles: confocal microscopy and digital image analysis.....	56-60
<i>Betül Yılmaz Öztürk, Derviş Öztürk</i>	
Eskişehir ilinde yayılış gösteren <i>Convolvulus L.</i> (Convolvulaceae) türleri üzerine taksonomik araştırmalar	61-66
<i>Derviş Öztürk</i>	
Öksin bölgesinde plantasyon yapılan ve tahribata uğramamış ormanlarda bir Akdeniz türünün (<i>Arbutus unedo</i>) yaprak karakterleri	67-72
<i>Hakan Yılmaz, Hamdi Güray Kutbay, Burak Sürmen</i>	
Sisplatin ve valproik asitin indüklediği toksisiteye karşı kudret narının <i>Drosophila melanogaster</i>'in yaşama yüzdesi ve ömür uzunluğu üzerine etkisi	73-78
<i>Deniz Altun Çolak, Çağla Ersöz</i>	
Investigation of nanoparticle use in geopolymer production	79-83
<i>Begüm Seda Öğün, Emek Möröydor Derun</i>	
Exopolysaccharide (EPS) production of halophilic bacteria	84-89
<i>Hilal Başer, Zehranur Yuksekdağ</i>	
Practical notes for quantification of antibiotics resistance bacteria and antibiotics resistance genes in wastewater	90-91
<i>Shadman Tariq Sadiq, Saif Talib Jasim, Aymen A. AL-Bayati, Salar Hassanzadeh, Asiye Esra Eren, Gülhan Tunç</i>	



Method Validation for The Determination of Toxic Elements in Fizzy Fruity Mineral Water Drinks Using ICP-MS

Murat Kilic¹ , Serpil Kilic^{1*} ¹ Akdeniz University, Food Safety and Agricultural Research Center, Antalya, Turkey*Corresponding author : serpilkilic@akdeniz.edu.tr
Orcid No: <http://orcid.org/0000-0002-4940-1839>Received : 29/07/2019
Accepted : 26/08/2019

Abstract: The presence of metallic impurities in fizzy fruity mineral water drinks can constitute health hazards to the public. In this study, the Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) was chosen to be validated, and applied in suitable method of analysis for determination of antimony, lead and cadmium in samples. The detection limits, quantification limits, linearity, accuracy parameters were studied under optimised ICP-MS conditions. The method trueness was confirmed by using certified references materials LGC soft drink and obtained results had acceptable Z-score values. The results obtained make the validated method suitable for a precise determination of the toxic elements in different brands of samples at these low concentration values. The results obtained were checked with permissible levels, daily intake (EDI), target hazard quotient (THQ) and hazard index (HI).

Keywords: Fizzy fruity mineral water, Health risk, ICP-MS.

© EJBACS. All rights reserved.

1. Introduction

Fizzy fruity mineral water drinks are non-alcoholic beverages that typically contain carbonated water. Although regular intake of carbonated soft drinks has been associated with human health problems, carbonated mineral waters remain one of the most frequently consumed ready to drink beverages in the world (Barbara et al., 2015). The high consumption rate of fizzy drink is attributed to the characteristic taste and flavour as well as their thirst quenching potential (Phillip et al., 2013).

The presence of some heavy metals in these drinks which may be due to environmental pollution from surface and underground water have been reported (Galadima et al. 2012). Lead, cadmium and antimony are non-essential metals as they are toxic even in trace amounts. Toxic elements can be very harmful, even at low concentration. According to the United States Environmental Protection Agency (USEPA), and the International Agency for Research on Cancer (IARC), these metals are also classified human carcinogens based on epidemiological studies (IARC, 2006). Human exposure to these toxic metals has risen as a result of increase of their uses in several industrial, agricultural and technological applications (Tchounwou et al., 2012). Trace elements are very important due to their adverse health effects on human metabolism, and therefore, their analysis methods are also an important part of public health studies. The

monitoring of heavy metals in water and foods are therefore of great importance in protecting the public from the hazards related to these metals (Lee et al., 2006; Mendil et al., 2010; Kilic et al., 2015; Kilic et al., 2018a; Kilic et al., 2018b).

Therefore, this study presents the establishment and validation of analytical method for determination of Pb, Cd and Sb in fizzy fruity mineral water drinks using ICP-MS. The work described here establishes a simple and efficient method for sample preparations including additional different kinds of soft drink samples. Results obtained were compared with permissible levels set out by WHO (World Health Organization) and evaluated for the risks to human health. The analytical performances of the method such as linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), specificity/selectivity and recovery (%) were determined. The obtained results were checked with permissible levels, daily intake (EDI), target hazard quotient (THQ) and hazard index (HI).

2. Materials and Method

2.1. Reagents

Stock calibration standard solutions VHG (10 mg/L) of Pb, Cd and Sb prepared in 1% HNO₃ were purchased from Manchester, USA. Suprapur® concentrated nitric acid (HNO₃) 65 % (w/w) was purchased from Merck-Germany. Deionized water was produced using Water Purification

System equipped with Millipore® ultrapure (Bedford, USA).

2.2. Standards preparation

Standard solutions were prepared by diluting 10 mg/L of metals stock standard solutions of Pb, Cd, Sb to 100 mL with 2 % (v/v) HNO₃. Six working standard solutions, covering a range of 0.5-50 µg/L were prepared by diluting intermediate standard solutions with 2 % (v/v) HNO₃.

2.3. Sample preparation

18 fizzy fruity mineral water drinks samples were collected for this study and were carried to the laboratory in the original glass bottles. Bottle caps of samples were opened at the moment of sample preparations and submitted to degassing process in ultrasonic bath for 15 min. After this step, samples were diluted to 50 mL by using 2% (v/v) HNO₃ solution and the samples were analysed by using ICP-MS. The optimized conditions and values of ICP-MS are summarized in Table 1.

Table 1. ICP-MS operating conditions

Spectrometer	Elan DRC-e (Perkin Elmer SCIEX, Norwalk, CT, USA)
Sample Introduction	Scott Spray Chamber
RF Power	1000
Skimmer Cone	Nickel
Sampler Cone	Nickel
Gas flow rates (L min ⁻¹)	Nebulizer gas flow: 0.91, Auxillary gas flow: 1.20 Plasma gas flow: 17
RF Power	1000
Lens Voltage	6.50
Nebulizer	Meinhard TQ plus Quartz 0.5 ml
Scannig mode	Peak hopping
Analytical masses (amu)	Standart mode ¹²¹ Sb, ²⁰⁸ Pb, ¹¹¹ Cd
Number of sweeps/reading	20
Number of readings /replicate	1
Number of replicates	3
Auto sampler	CETAX ASX-520
Dwell time per AMU (ms)	50
Sample flush	Time (50), speed (+/- rpm)-48
Read delay	Time (15), speed (+/- rpm)-20

2.4. Validation parameters

Several parameters have been taken into account and evaluated for the method validation, namely, linear range, method linearity, recovery at three levels (minimum, medium and maximum) LOD, LOQ, trueness by CRM, and method repeatability. Analytical method validation of

ICP-MS for the determination of Pb, Cd, Sb was applied in accordance with Eurachem Guide, LGC-soft drink BV 223 Round 519 reference material standart (EURACHEM, 1998).

2.5. Health risk assessment

The estimated daily intake (EDI) of toxic metal in this study was determined by the Eq. (1), as reported by WHO, (2009).

$$\text{Daily intake (EDI)} = \sum \left[\frac{\text{Concentration of toxic metals in food} \times \text{Mean food intake}}{\text{Body weight}} \right] \quad (1)$$

Dietary intake of toxic metals determined in this study were compared with the provisional tolerable weekly intake (PTWI) by JECFA (UNEP/FAO/WHO, 1992). Target Hazard Quotient is described by the following Eq. (2) by USEPA (USEPA, 2009).

$$\text{THQ} = \frac{(\text{EF} \times \text{ED} \times \text{FI} \times \text{MC})}{\text{RfD} \times \text{BW} \times \text{AT}} \times 10^{-3} \quad (2)$$

where THQ = target hazard quotient, EF = exposure frequency, ED = exposure duration equivalent to average life time, FI = food mean ingestion rate, MC = element concentration in the samples, AT = average exposure of life time and BW is average body weight. Reference oral doses (RfD) used for Cd, Pb and Sb were 1 x 10⁻³, 4 x 10⁻³ and 4 x 10⁻⁴ mg/kg/day, respectively (USEPA, 2013).

The hazard index (HI) is the sum of the individual target hazard quotients of the elements assessed. The health risks associated were evaluated according to Eq. (3).

$$\text{HI} = \text{Total THQ} = \text{THQ (As)} + \text{THQ (Cd)} + \text{THQ (Pb)} \quad (3)$$

3. Results and Discussion

The assay analytical method developed was subjected to validation by performing specificity, linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy. The accepted values of correlation coefficients were greater than 0.995, as set, as target to obtain accurate quantification as an analytical linear response over certain concentration ranges. The LOD for the elements investigated were found to be in the range of 0.03 and 0.14 µg L⁻¹. The limits of quantification, expressed as the lowest validated spike level with acceptable criteria for accuracy and precision. The minimum practical concentrations of tested elements in the analyzed drinks, which can be determined with acceptable accuracy and precision were performed by analyzing ten replicates (1 µg L⁻¹) for Sb, Cd, and Pb. In order to verify the recovery, standard reference materials from LGC soft drink was analyzed using the validated method. The relative standard deviation (RSD) was ranged between 1.0 and 4.8 % (Table 2).

Table 2. Validation parameter results

Elements	Regression equation	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% RSD
Pb	$y = 14524x - 2116$	0.5-50	0.14	0.45	4.8
Cd	$y = 2541.4x + 86.385$	0.5-50	0.06	0.20	2.0
Sb	$y = 5796.4x - 591.97$	0.5-50	0.03	0.11	1.0

For precision calculations, spiking was performed at three fortification levels. The solution was spiked with minimum ($1 \mu\text{g L}^{-1}$), medium ($15 \mu\text{g L}^{-1}$), and maximum ($40 \mu\text{g L}^{-1}$) levels and analyzed by the proposed method for Sb, Pb, and Cd. The recoveries were found between 95 and 101% for $1 \mu\text{g L}^{-1}$, 97 and 105% for $15 \mu\text{g L}^{-1}$, and 99 and 103% for $40 \mu\text{g L}^{-1}$ concentrations. Results are submitted in Table 3.

Table 3. Recovery values (%) of the elements

Elements	Recovery values		
	Minimum ($1 \mu\text{g L}^{-1}$)	Medium ($15 \mu\text{g L}^{-1}$)	Maximum ($40 \mu\text{g L}^{-1}$)
Pb	95±4.5	105±1.3	99±1.9
Cd	99±2.0	97±2.7	103±0.9
Sb	101±1.1	100±2.6	99±2.1

The Z-score is a statistical measure that quantifies the distance (measured in standard deviations) a data point is from the mean of a data set. All measured results were within satisfactory range and had acceptable Z-score ($-2 \leq \text{Z-score} \leq 2$).

Table 4. Element composition of samples ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Sample		Sb	Pb	Cd
Fizzy fruity mineral water (n=18)	Min	<LOD	<LOD	<LOD
	Max	<LOD	0.5	<LOD
	Mean	<LOD	0.2	<LOD
	Std. Deviation	<LOD	0.2	<LOD
	WHO 2011		20	10
EU 2014		5	10	5

Eighteen natural fizzy fruity mineral water having different brands and most consumed were analyzed by the developed method. According to the results in **Table 4**, cadmium and antimony could not be determined (<LOD), in the samples. Lead was determined in the some brand samples. As reported in a study completed in Poland, $0.14 \mu\text{g L}^{-1}$ lead, $1.32 \mu\text{g L}^{-1}$ arsenic and $0.45 \mu\text{g L}^{-1}$ cadmium have been detected in bottled mineral waters samples purchased from markets (Astel et al., 2014). The results obtained for the lead and arsenic contents were very low compared to literature data. All these results were found to be much lower than the maximum permissible limits of

metals contaminants stated by WHO, and Europeans standards in drinking and potable bottled natural mineral water (EU, 2003; WHO, 2006).

Dietary intake calculations were made according to the Turkey Development Bank data reports. Development Bank of Turkey reported an average body weight for Turkish population as 66.5 kg, while natural mineral water consumption for population is 4.4 L/year. Compared to the safety standard set by FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) for antimony, a PTWI of $6 \mu\text{g kg}^{-1}$ bw; for lead, a PTWI of $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ bw; for cadmium, a PTWI of $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ bw (FAO/WHO, 1997; WHO, 2003). The estimated lead intake level from this study correspond lower from the PTWI.

The THQ results was determined 9×10^{-6} for Pb. The parameters used for risk assessment give an estimation of the human risk evaluation of exposure to metal in the samples stated. THQ value less than 1 indicates that there is no significant risk of noncarcinogenic effects for the exposure (USEPA, 1989). The results showed that the consumption rate of fizzy fruity mineral water drinks in Turkey can not result over exposures to these chemicals.

4. Conclusions

In this study, ICP-MS technique was used to validate an analytical method for the determination of toxic-trace elements in fizzy fruity mineral water drinks. The validated method proved to be fast, easy and simple, and therefore, it can be very useful for routine laboratory applications. Precise and accurate results were obtained with the validated method even at very low levels of concentrations. According to the results of the natural mineral water analyses, Cd concentration levels were at the LOD levels. Arsenic and lead were detected in some samples. The method quantification limits were found to be much lower than the maximum permissible limits of metal contaminants set by WHO and Europeans Standards in drinking and bottled natural mineral waters. The health risk assessment indices generally indicated no risk concern with respect to human exposure and public health. Therefore, this might be considered as a useful tool by governmental organizations.

Acknowledgements

This work was financially supported by the University of Akdeniz Scientific Research Projects Support Unit (FBA-2019- 4371).

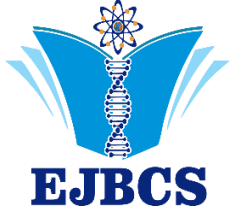
Authors' contributions: S. Kilic designed the study, interpreted the heavy metal results and M. Kilic collected samples from different locations, analyzed for heavy metals.

Conflict of interest disclosure: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Arif TJ, Mudsser A, Kehkashan S, Arif A, Inho C, Qazi M, Rizwanul H 2015. Heavy metals and human health:

- Mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *Int J Mol Sci* 16: 29592-29630.
- Astel A, Michalski R, Lyko A, Czaplá MJ, Bigus K, Szopa S, Kwiecinska A 2014. Characterization of bottled mineral waters marketed in Poland using hierarchical cluster analysis. *J Geochem Explor* 143: 136-145.
- Baba A, Ereeş FS, Hiçşönmez Ü, Çam S, Özdilek HG 2008. An assessment of the quality of various bottled mineral water marketed in Turkey. *Environ Monit Assess* 139: 277-285.
- Barbara BAF, Daniel MB, Ricardo JC 2015. Determination of metals in soft drinks packed in different materials by ETAAS. *Food Chem* 185:488-494.
- Bertoldi D, Bontempo L, Larcher R, Nicolini G, Voerkelius S, Lorenz GD, Ueckermann H, Froeschl H, Baxter MJ, Hoogewerff J, Brereton P 2011. Survey of the chemical composition of 571 European bottled mineral waters. *J Food Compost Anal* 24 (3): 376-385.
- EC 1998. COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC of 3 November 1998 on The Quality of Water Intended for Human Consumption. *Official Journal of the European Communities* 330: 32.
- EU 2003. EU Directive 2003/40/EC, Establishing The List, Concentration Limits and Labeling Requirements for The Constituents of Natural Mineral Waters and The Conditions for Using Ozone-enriched Air for The Treatment of Natural Mineral Waters and Spring Waters. *Official Journal of the European Communities* 126, 34-39 (22.05.2003).
- EU 2014. EUROPEAN UNION (Drinking water) Regulations, S.I. No. 122, 21, available from <http://www.irishstatutebook.ie/eli/2014/si/122/made/en/pdf>
- EURACHEM 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM: Uppsala, Sweden, 75pp. <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>
- FAO/WHO 1997. FAO/WHO Food Consumption and Exposure Assessment of Chemicals. Report of FAO/WHO Consultation WHO, Geneva pp. 17-25.
- Galadima A, Garba ZN 2012. Heavy metals pollution in Nigeria: causes and consequences. *Elixir Pollut.* 45: 7917-7922.
- Gutierrez-Reguera F, Montoya-Mayor R, Seijo-Delgado I, Ternero-Rodríguez M 2016. Chemical analysis and nutritional assessment of trace elements in natural mineral waters bottled in Spain. *Afinidad* 73 (574): 102-118.
- IARC 2006. Inorganic and Organic Lead Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human 87: 519.
- Kilic S, Yenisoy-Karakas S, Kilic M 2015. Metal contamination in fruit juices in Turkey: Method validation and uncertainty budget. *Food Anal Meth* 8: 2487-2495.
- Kilic S, Cengiz MF, Kilic M 2018a. Monitoring of metallic contaminants in energy drinks using ICP-MS. *Environ Monit Assess* 190:202.
- Kilic S, Cam İB, Tongur T, Kilic M 2018b. Health risk assessment of exposure to heavy metals and aflatoxins via dietary of dried red pepper from marketplaces in Antalya, Southern Turkey. *J Food Sci* 83(10): 2675-2681.
- Lee HS, Cho YH, Park SO, Kye SH, Kim BH, Hahn TS, Kim M, Lee JO, Kim CI 2006. Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury. *J Food Compost Anal* 19: 31-37.
- Mendil D, Demirci Z, Tuzen M, Soylak M 2010. Seasonal investigation of trace element contents in commercially valuable fish species from the Black sea, Turkey. *Food Chem Toxic* 48(3): 865-870.
- Misunda A, Frengstad B, Sewersd U, Reimanna C 1999. Variation of 66 elements in European bottled mineral Waters. *Sci Total Environ* 243(244): 21-41.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ 2012. Heavy metals toxicity and the environment. *EXS*, 101:133-164.
- Ubong IU, Obunwo C, Faafa A 2016. Essential and non-essential metals in soft drinks consumed and sold in Port Harcourt, Nigeria. *J Appl Res* 2(8): 550-557.
- WHO 2006. Guidelines for Drinking-Water Quality, First Addendum to third edition. Recommendations, vol. 1 (available on: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf).
- WHO 2009. Chapter 6: Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food, Environmental Health Criteria.
- WHO 2011. Guidelines for Drinking-Water quality. World Health Organization, Fourth edition, pp. 564.
- WHO 2003. Antimony In Drinking-Water Background Document for Development WHO Guidelines for Drinking-water Quality, Geneva: WHO.
- UNEP/FAO/WHO 1992. Assessment of Dietary Intake of Chemical Contaminants. WHO/HPP/FOS/92.6, UNEP/GEMS/92.F2, United Nations Environmental Program, Nairobi.
- USEPA 1989. Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I Human Health Evaluation Manual (Part A) Interim Final, vol 1. Office of Emergency and Remedial Response U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC. 20450.
- USEPA 2009. United States Environmental Protection Agency, Risk-Based Concentration Table. Philadelphia: United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA 2013. Risk Based Concentration Table. Retrieved from <https://www.epa.gov/reg3hwmd/risk/human/index.htm>



Van kedilerinde total beyin hacminin bilgisayarlı tomografi görüntüleri kullanılarak hesaplanması

Osman Yılmaz^{1*}, Taylan Tugrul²

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Van, Türkiye
² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Van, Türkiye

*Corresponding author : osman_40_5@hotmail.com
Orcid No: 0000-0003-2013-9213

Received : 26/07/2019
Accepted : 26/08/2019

Özet: Canlıların beyindeki hacimsel değişikliklerin klinik teşhis ve tedavide oldukça önemli bir yeri vardır. Bu çalışmada, Van Gölü ve çevresinde yetişen, yetişkin Van kedilerinin bilgisayarlı tomografi görüntüleri kullanılarak, total beyin hacim değerlerinin hesaplanması ve bu değerlerin cinsiyetler arasındaki farklılıklarının belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada 10 erkek, 10 dişi olmak üzere toplam 20 adet erişkin Van kedisi kullanıldı. Hayvanlar ketamin- xylazin kombinasyonu ile anesteziye alındı. Anestezi altındaki hayvanlar bilgisayarlı tomografi ile taranarak görüntüleri elde edildi. Elde edilen görüntülerden Prowess Panther Treatment Planning System V5.01 programı kullanılarak hayvanların total vücut hacimleri ve total beyin hacimleri ölçüldü. İncelenen ölçüm değerlerinin cinsiyetler arasındaki farklılıklarını tespit etmek için istatistiki olarak analizi yapıldı. Buna göre, Ağırlık (A), Total Vücut Hacmi (TVH) ve Total Beyin Hacmi (TBH) ölçüm değerlerinin erkek kedilerde dişi kedilere göre daha yüksek olduğu saptandı. Bu farkların istatistiki olarak önemli düzeyde olduğu görüldü ($p<0.05$). Bununla birlikte, Total Hacim oranı (THO) bakımından ise, cinsiyetler arasında istatistik olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,05$). Bu ölçüm değerinin dişi kedilerde, erkek kedilere göre daha fazla olduğu belirlendi. Sonuç olarak, Van kedilerinde total beyin hacminin ölçüm değerlerinin istatistiksel olarak erkek ve dişiler arasındaki farklılıkları tespit edildi. Çalışmanın bu hayvanlarda beyin atrofisi başta olmak üzere, çeşitli nöroanatomik ve nörodejeneratif hastalıkların değerlendirilmesi açısından önemli olduğu görüşüdeyiz.

Anahtar kelimeler: Beyin hacmi, Bilgisayarlı tomografi, Van kedisi

Evaluation of total brain volume by using computed tomography images in the Van cats

Abstract: Volumetric changes in the brain of living beings have a very important place in clinical diagnosis and treatment. In this study, it was aimed to determine the total brain volume values by using computed tomography images of adult Van Cats, growing around and Lake Van, and to determine the differences between these values in both genders. A total 20 adult Van Cats, 10 male and 10 female, were used in the study. Animals were anesthetized with ketamine-xylazine combination. Anesthetized animals were scanned by computed tomography, and images were obtained. Then, total body volumes and total brain volumes of the cats were measured from these images by using the Prowess Panther Treatment Planning System V5.01 program. Subsequently, these measured values were analyzed statistically in order to determine the differences between the genders. According to this, Weight (W), Total Body Volume (TBV), and Total Brain Volume (TBV) measurement values were found to be higher in male cats than female cats. These differences were observed to be statistically significant ($p < 0.05$). In addition, there was a statistically significant difference between the sexes in terms of the Total Volume Ratio (TVR) measurement value ($p < 0.05$). However, it was observed that these measurement value was higher in female cats than in male cats. In conclusion, the biometric values of total brain volume have been determined to be statistically different between male and female cats. We believe that this study, especially atrophy of the brain, is important for the evaluation of various neuroanatomical and neurodegenerative diseases in Van Cats.

Keywords: Brain volume, Computerized tomography, Van cat.

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Türkiye’de Van Gölü ve çevresinde yetişen Van kedisi, bölgenin önemli bir kültürel zenginlik kaynağıdır. Son yıllarda fiziksel özelliklerinden dolayı oldukça büyük bir ilgi toplayan bu kediler, üçgen şeklinde baş, küçük burun, yuvarlak yüz, dik kulak, uzun vücut ve bol tüylü kuyruk

yapısı, farklı göz rengi (her iki gözü sarı veya mavi olabileceği gibi, bir gözü sarı diğer gözü mavi renkte olabilir), vücutlarında değişik boylarda ve genellikle fildişi renginde yumuşak tüyler bulundurması, yüzmeyi sevmesi, temizliği, üstün öğrenme yeteneği ve zekiliğiyle bilinmektedir (Odabaşoğlu ve Ateş, 2000).

Son yıllarda bilgisayar destekli öğrenme alanlarındaki teknolojik gelişmeler, çeşitli yazılım programları ve üç boyutlu modellemeler sayesinde birçok anatomik yapının özelliklerinin belirlenmesinde önemli kolaylıklar meydana getirmiştir (Brenton ve ark., 2007). Özellikle küçük hayvanlarda bilgisayarlı tomografi ve üç boyutlu modelleme programları, beyin, beyindeki anatomik yapılar ve meydana gelen değişikliklerin görüntülenmesinde standart bir görüntüleme yöntemi olarak kullanılmaktadır (Ohlerth ve Scharf, 2007). Bununla birlikte, günümüzde beyin hacmi de bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme gibi medikal görüntüleme yöntemleri ve birçok yazılım programları sayesinde oldukça hızlı bir şekilde değerlendirilmektedir. Beyin hacmi, birçok hastalığın tanısı, teşhis ve tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir (Kurtoğlu, 2013). Yapılan çalışmalarda otizim, şizofreni, epilepsi, alzheimer, multiple skleroz, hiperaktivite bozukluğu gibi birçok nörodegeneratif hastalıkta beyin hacimlerinde önemli değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Acer ve ark., 2013; Ömerli ve ark., 2013).

Bilgisayarlı Tomografi görüntülerinden beyin hacmini tahmin etmede birçok manuel, yarı otomatik ve otomatik yöntemler bulunmaktadır. Manuel yöntemde beyin hacminin hesaplanması için nokta sayımı ve dilimleme prensibini temel alan stereoloji yöntemi kullanılırken; otomatik veya yarı otomatik teknikteki hacim hesaplamalarında ise, ilgili anatomik yapıdaki noktaların manuel olarak işaretlenmesi ile yoğunluk ve eşik esaslı görüntü segmentasyonunun sağlanmasını temel alan birçok yazılım programı sayesinde gerçekleştirilmektedir (Creasey ve ark., 1986; McEvoy, 2007; Acer ve ark., 2008; Acer ve ark., 2009; Kurtoğlu, 2013).

Yapılan literatür araştırmalarında Van kedilerinde beyin hacmi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, yetişkin Van kedilerinin bilgisayarlı tomografi görüntüleri kullanılarak, total beyin hacim değerlerinin hesaplanması ve bu değerlerin cinsiyetler arasındaki farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışmanın, Van kedilerinin anatomik özelliklerinin ortaya çıkarılması açısından önemli olduğu görülmüştür.

2. Materyal ve Metot

2.1. Deneysel Hayvanları

Araştırmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Van Kedisi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen 4 ile 6 yaşları arasında, 3100 - 6000 gr ağırlığında 10 erkek, 10 dişi olmak üzere toplam 20 adet yetişkin Van kedisi kullanıldı. Belirlenen Van kedilerine çalışmadan bir gün öncesine kadar ad libitum olarak içme suyu ve standart kedi yemi verildi.

2.2. Anestezi

Çalışmaya dahil edilen Van kedileri numaralandırılarak bir gün öncesinden aç bırakıldı. Tetkik yapılacağı gün kedilerin anestezi için Ketamine (15 mg/kg, IM, Ketazol® %10 enjektabl, İnterhas Veteriner İlaçları, Ankara) ile Xylazine (1-2 mg/kg, IM, Alfazyne® %2 enjektabl, Ege - Vet Veteriner İlaçları, İzmir) kombinasyonu kullanıldı.

2.3. Bilgisayarlı Tomografi ile görüntüleme

Kedilerin Bilgisayarlı Tomografi (BT) tetkikleri için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda mevcut 16 kesitli çok sıralı bilgisayarlı tomografi (BT) cihazı (Somatom Sensation 16; Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) kullanıldı. Gantry içerisine serilen "disposable" örtü üzerine anestezi altındaki kediler "head first" olacak şekilde prone pozisyonunda simetrik olarak yerleştirildi. Çekim sırasında BT cihazı parametreleri; KV / Effective mAs / Rotation time (sec) değerleri 120 / 120 / 0.75; gantry rotation period 420 ms; fiziksel dedektör collimation, 16 × 0.6 mm; kesit kalınlığı, 0,75 mm; final section collimation 32 × 0.63 mm; feed/rotation, 6 mm; Kernel, U90u; increment 0.5 mm; resolution 512 × 512 olacak şekilde belirlendi. BT uygulama dozlarının parametreleri ve yapılan taramalar, standart protokoller ve literatür esas alınarak gerçekleştirildi (Prokop, 2003; Kalra ve ark., 2004). Elde edilen axial imajlar Digital Imaging and Communication in Medicine (DICOM) formatında işlenmek üzere iş istasyonuna (Prowess Panther Treatment Planning System V5.01) aktarıldı.

2.4. Görüntülerden Volümetrik Ölçümlerinin Alınması

Elde edilen görüntülerden beyine ait volüm ölçümlerini yapabilmek amacıyla, iş istasyonu üzerinde aksiyel görüntülerden her bir yapı için, beyin görüntüsünün girdiği tüm kesitler çizildi. Çizilen konturları iş istasyonunda bulunan Prowess Panther Treatment Planning System V5.01 software kapsamındaki volüm aplikasyonu aracılığıyla birleştirilerek volümetrik ölçümler elde edildi (Şekil 1).

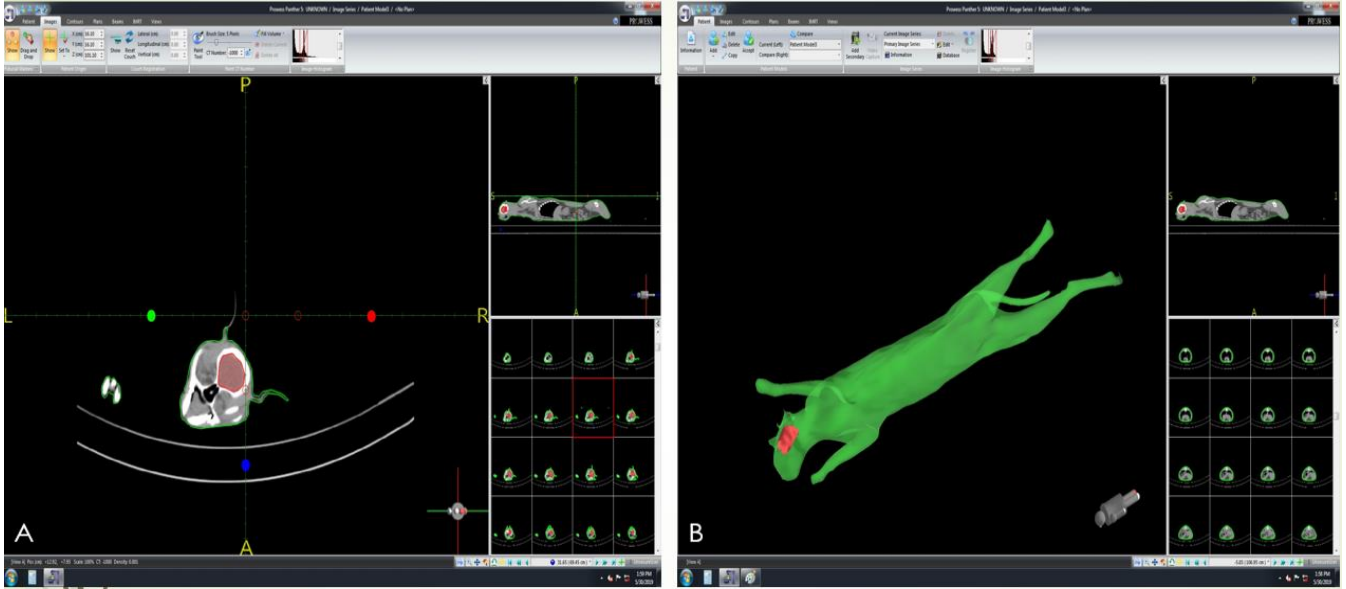
Bu kapsamda alınan ölçüm değerleri ve kısaltmaları şu şekilde belirlendi:

Yaş	Y
Ağırlık	A
Total Vücut Hacmi	TVH
Total Beyin Hacmi	TBH
Total Hacim Oranı = Total Beyin Hacmi/ Total Vücut Hacmi*100	THO

Çalışmada terminolojik terimler için Nomina Anatomica Veterinaria (Nomina Anatomica Veterinaria, 2017) esas alındı. Ayrıca çalışmada kullanılan kedilerin kilo ölçümleri için digital terazi (TESS®, RP-LCD, Çomak Terazi, İstanbul) kullanıldı.

2.5. İstatistik Analiz

Çalışmamızdaki sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; Medyan, Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değerler olarak ifade edildi. Sürekli değişkenler bakımından cinsiyete göre karşılaştırmada Mann-Whitney U testi yapıldı. Bu ölçümler arasındaki ilişkiyi belirlemede Spearman's korelasyon katsayıları hesaplandı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %1 ve %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (IBM SPSS for Windows, Ver.21) istatistik paket programı kullanıldı.



Şekil 1. ProWess Panther Treatment Planning System V5.01 yazılım programı kullanılarak axial görüntülerden (A), üç boyutlu rekonstrüksiyon görüntüsü (B) elde edilerek TBH ve TVH ölçümlerinin alınması işlemi.

3. Bulgular

Bilgisayarlı tomografi görüntülerinden ProWess Panther Treatment Planning System V5.01 yazılım Programı ile elde edilen volümetrik ölçüm değerleri sürekli değişkenler bakımından erkek ve dişilerdeki grup ortalamaları ve

cinsiyetler arasındaki farklılıkları tespit etmek için istatistiki olarak analizi yapıldı. İstatistik sonuçlarına bakıldığında bu ölçüm değerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar ($p < 0,05$) kaydedildi. Değerlendirilen ölçüm değerleri Tablo 1-2'de ve Şekil 1'de sunuldu.

Tablo 1. Cinsiyete göre volümetrik ölçüm değerleri

	Cinsiyet	Median	Mean	Std. Dev.	Min.	Max.	*p.
Y (yıl)	Erkek	4,50	4,60	,70	4,00	6,00	,702
	Dişi	4,00	4,50	,71	4,00	6,00	
A (gr)	Erkek	5000,00	5020,00	569,21	4100,00	6000,00	,001
	Dişi	3350,00	3530,00	454,73	3100,00	4300,00	
TVH (cm ³)	Erkek	4337,60	4361,96	574,16	3344,30	5385,00	,001
	Dişi	2986,05	3004,92	338,72	2522,40	3642,80	
TBH (cm ³)	Erkek	23,05	23,26	1,80	20,90	26,60	,002
	Dişi	20,65	20,72	1,71	18,10	23,10	
THO (cm ³)	Erkek	,53	,54	,10	,41	,80	,002
	Dişi	,69	,69	,07	,58	,80	

* Mann-Whitney U testi sonuçları; $p < 0,05$ olanlar istatistik olarak anlamlı (önemli) bulunmuştur.

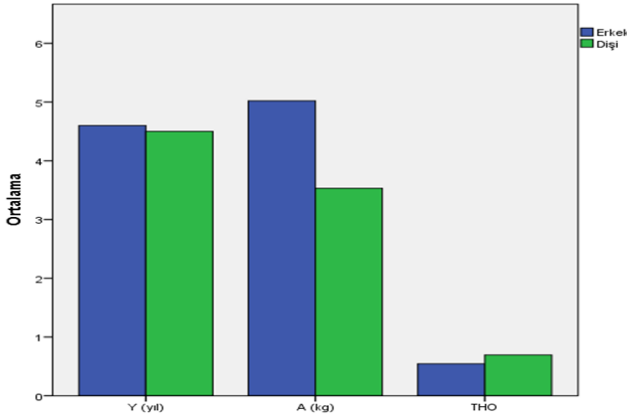
Cinsiyete göre beynin volümetrik ölçüm değerleri tablo 1'de verildi. Buna göre, Ağırlık (A), Total Vücut Hacmi (TVH) ve Total Beyin Hacmi (TBH) ölçüm değerlerinin erkek kedilerde dişi kedilere göre daha yüksek olduğu saptandı. Bu farkların istatistik olarak önemli düzeyde olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bununla birlikte, Total Hacim oranı (THO) bakımından ise, cinsiyetler arasında istatistik olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu ölçüm değerinin dişi kedilerde, erkek kedilere göre daha fazla olduğu belirlendi. Tablo 2'de erkek ve dişilerde ayrı ayrı olmak üzere, "ölçümler arası korelasyon katsayıları"

verildi. Buna göre bakıldığında; erkek kedilerde; TVH ile Ağırlık arasında istatistik olarak anlamlı (önemli) bir ilişki gözlemlendi ($p < 0,05$). Başka bir ifadeyle, ağırlık arttıkça TVH de artış göstermektedir ve bu artışın derecesi %98,8'dir. Benzer şekilde, THO ile TVH ve Ağırlık arasında da anlamlı ($p < 0,05$) ve negatif bir ilişki saptandı. Dişilerde ise, THO ile TVH arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki gözlemlendi ($p < 0,05$). Başka bir ifadeyle, TVH arttıkça THO azalmıştır bu azalışın derecesi %68,5'tir. Bunların aksine diğer ölçümler arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p > 0,05$).

Tablo 2. Cinsiyete göre volümetrik ölçüm değerleri arasındaki ilişki

	Erkek				Dişi			
	Yaş	A (gr)	TVH (cm ³)	TBH (cm ³)	Yaş	A (gr)	TVH (cm ³)	TBH (cm ³)
A (gr)	r ,014				-,479			
TVH (cm ³)	r -,080	,988**			,298	,379		
TBH (cm ³)	r ,386	-,012	-,024		,160	,086	,455	
THO (cm ³)	r ,147	-,791**	-,818**	,498	-,090	-,355	-,685*	,224

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; r: Spearman korelasyon katsayısı



Şekil 2. Cinsiyete göre Yaş, Ağırlık ve Total Hacim Oranı ölçümlerinin dağılımı.

Şekil 2’de yaş, ağırlık ve THO ölçüm değerlerinin cinsiyete göre dağılımı verilmiştir. Buna göre, yaş ve ağırlık ölçüm değerlerinin erkek kedilerde, THO ölçüm değerlerinin ise dişi kedilerde daha yüksek olduğu gözlemlendi.

4. Tartışma ve Sonuç

Klinikte hastalıkların teşhisi, takibi, tedavi planlaması, tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesi, bir takım operatif uygulamaların takibi gibi konularda ilgili anatomik yapıların hacminin bilinmesine sıklıkla ihtiyaç duyulmaktadır (Chia ve Baddeley, 2000; Sahin ve ark., 2003; Akalan ve Demirkan, 2013). Bununla birlikte, beyin gibi kompleks yapıdaki organların hacimlerinin tahmin edilmesinde fiziksel muayene ile yeterli bilgi elde edilemediği durumlarda röntgen, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme gibi birçok medikal görüntüleme yöntemlerine başvurulur, bu görüntüleme yöntemleri ve kullanılan üç boyutlu modelleme programları sayesinde canlıya zarar vermeden hızlı, güvenilir ve doğruluğu yüksek bir şekilde çeşitli ölçümler alınabilmekte ve değerlendirilmesi yapılabilmektedir (Kurtuluş, 2013).

Allen ve ark., (2003) tarafından sağlıklı 23 erkek ve 23 bayan beyni üzerinde yapılan bir çalışmada erkeklerde beyin hacimlerinin ölçüm değerlerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu bilgiye paralel olarak, Sahin ve ark., (2001) tarafından 10 rat, 12 kuş ve 17 kuzu beyni üzerinde Cavalieri metodu ile yapılan hacim çalışmasında beyin hacimlerinin ölçüm değerlerinin erkek ratlarda $605.5 \pm 17.12 \text{ mm}^3$, dişi ratlarda $592.4 \pm 13.09 \text{ mm}^3$; erkek kuşlarda $759.91 \pm 24.62 \text{ mm}^3$, dişi kuşlarda $689.03 \pm 17.0 \text{ mm}^3$;

erkek kuzularda $40.03 \pm 1.3 \text{ cm}^3$; dişi kuzularda $36.13 \pm 0.79 \text{ cm}^3$ olarak bulunmuş ve kuzu ile kuşlardaki bu ölçüm değerlerinin istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Mayhew ve ark.(1990) Cavalieri prensibiyle evcil memeli hayvanların beyni üzerine yaptığı hacim hesaplamalarında bu değerlerin kedilerde 15.9 cm^3 ; köpeklerde $48,7 \text{ cm}^3$; keçilerde $50,8 \text{ cm}^3$; domuzlarda $58,3 \text{ cm}^3$; sığırlarda $235,5 \text{ cm}^3$; atlarda $326,3 \text{ cm}^3$ olarak ölçmüşlerdir. Ayrıca Schmidt ve ark.,(2014)’te brachiocephalik ve metacephalik köpek ırklarının total beyin hacimlerinin ölçüm değerlerinin sırasıyla $84.30 \text{ cm}^3 \pm 1.41$ ve $77.18 \text{ cm}^3 \pm 1.41$ olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte Nadimi ve ark. (2018)’te 11 köpek ve 15 kedi üzerinde yaptığı çalışmada beyin hacimlerinin köpeklerde $59580 - 92010 \text{ mm}^3$ arasında değiştiğini ortalama 68832.73 mm^3 olduğunu, kedilerde ise $14840 - 29900 \text{ mm}^3$ arasında değiştiğini ortalama 26420 mm^3 olduğunu tespit etmişlerdir. 10 erkek ve 10 dişi sağlıklı Van kedisinde yaptığımız çalışmada ise ortalama hacim değerlerinin erkeklerde $23,26 \text{ cm}^3 \pm 1,80$, dişilerde $20,12 \text{ cm}^3 \pm 1,71$ olduğu tespit edildi.

Vücut ağırlığı ve beyin hacmi arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir (Rathjen ve ark., 2003; Oguz ve ark., 2013; Schmidt ve ark., 2014). Van kedilerinde ise, TVH ölçüm değeri ile vücut ağırlığın arasında istatistik olarak anlamlı (önemli) bir ilişki gözlemlendi ($p < 0,05$). Başka bir ifadeyle, ağırlık arttıkça Total vücut hacmi de artış göstermektedir ve bu artışın derecesi %98,8’dir. Benzer şekilde, THO ile TVH ve Ağırlık arasında da anlamlı ($p < 0,05$) ve negatif bir ilişki gözlemlendi. Dişilerde ise, TVH ve TBH ile vücut ağırlığı arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi. Ancak, bu ölçümler arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki gözlemlenmedi ($p > 0,05$).

Bununla birlikte kedilerde boy ve yaş ile beyin hacmi de değişiklik ve gelişmelere uğramaktadır (Rathjen ve ark., 2003). Özellikle postpartum dönemin ilk evrelerinde yaş ile beyin hacminde önemli artışlar meydana gelmektedir (Oguz ve ark., 2013). Van kedilerinde ise, erkek ve dişilerde yaş ile total beyin hacmi ölçüm değerleri arasında pozitif bir korelasyon bulundu. Ancak bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$).

Bilgisayarlı tomografi görüntüleme ile hayvanlara bedensel herhangi bir zarar verilmeden, öldürülmeksizin anestezi altında ilgilenilen yapının istenilen kalınlıkta görüntüleri alınmakta ve bu görüntülerden çeşitli yazılım programları kullanılarak yine ilgilenilen yapıların üç boyutlu

rekonstrüksiyonu elde edilebilmektedir (Correia ve ark., 2005). Ayrıca, çeşitli anatomik yapıların görüntülenmesi, yorumlanması ve bu anatomik yapılara ait birçok ölçüm işlemleri kolay ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir (Yılmaz, 2018). Bu özelliklerinden dolayı gelişen teknolojiyle birlikte bilgisayarlı tomografi ve üç boyutlu modelleme programları Veteriner Anatomi alanında gün geçtikçe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özkadif, 2015).

Van kedilerinde total beyin hacminin ölçüm değerlerinin istatistiksel olarak erkek ve dişiler arasındaki farklılıkları tespit edildi. Çalışmanın bu hayvanlarda beyin atrofişi başta olmak üzere, çeşitli nöroanatomik yapıların ve birçok nörodejeneratif hastalıkların değerlendirilmesi açısından önemli olduğu görüşündeyiz.

Kaynaklar

- Acer N, Bayar B, Basaloglu H, Oner E, Bayar K, Sankur S 2008. Unbiased estimation of the calcaneus volume using the Cavalieri principle on computed tomography images. *Ann Anat* 190: 452-460.
- Acer N, Kurtoğlu E, Sağiroğlu A, Öztürk Ö, Ilıca T 2013. MRI Studio programı kullanılarak kafa içi yapıların niceliksel analizi. 15. Ulusal Anatomi Kongresi 5-8 Eylül 2013, Samsun, Türkiye.
- Acer N, Sahin B, Uçar T, Usanmaz M 2009. Unbiased estimation of the eyeball volume using the Cavalieri principle on computed tomography images. *J Craniofac Surg* 20: 233-237.
- Akalan MA, Demirkan AÇ 2013. Stereoloji ve veteriner hekimlikte kullanım alanları. *YYU Vet Fak Derg* 24 (2), 95 – 100.
- Allen JS, Damasio H, Grabowski TJ, Bruss J, Zhang W 2003. Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum. *NeuroImage* 18: 880-894.
- Brenton H, Hernandez J, Bello F, Strutton P, Purkayastha S, Firth T, Darzi A 2007. Using multimedia and Web3D to enhance anatomy teaching. *Comput Educ* 49: 32-53.
- Chia J, Baddeley A 2000. Accuracy of estimates of volume fraction. *Image Anal Stereol* 19: 199-204.
- Correia H, Balseiro S, Areia MD 2005. Sexual Dimorphism in the human pelvis: testing a new hypothesis. *HOMO - J Comp Hum Biol* 56(2): 153-160.
- Creasey H, Rumsey JM, Schwartz M, Duara R, Rapoport JL, Rapoport SI 1986. Brain morphometry in autistic men as measured by volumetric computed tomography. *Arch Neurol* 43: 669-672.
- Kalra MK, Maher MM, Toth TL, Hamberg LM, Blake MA, Shepard J, Saini S 2004. Strategies for CT radiation dose optimization. *Radiology* 230: 619-28.
- Kurtoğlu E 2013. Değişik yazılımlar kullanılarak beyin hacminin ve yüzey alanının MR görüntüleri ile hesaplanması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2013.
- Mayhew TM, Mwamengele GLM, Dantzer V 1990. Comparative morphometry of the mammalian brain: Estimates of cerebral volumes and cortical surface areas obtained from macroscopic slices. *J Anat* 172: 191-200.
- McEvoy FJ 2007. An application of image processing techniques in computed tomography image analysis. *Vet Radiol Ultrasound* 48: 528-534.
- Nadimi S, Molazem M, Jarolmasjed S, Nejad MRE 2018. Volumetric evaluation of pituitary gland in dog and cat using computed tomography. *Vet Res Forum* 9(4): 337 – 341.
- Nomina Anatomica Veterinaria 2017. Prepared by the international committee on veterinary gross anatomical nomenclature and authorized by the general assembly of the world association of veterinary anatomists (6th Edition). The Editorial Committee Hanover (Germany), Ghent (Belgium), Columbia, MO (U.S.A.), Rio de Janeiro (Brazil).
- Odabaşoğlu F, Ateş CT 2000. Van kedisi. Selçuk University Printing Office, First Edition, Konya.
- Oguz I, Yaxley R, Budin F, Hoogstoel M, Lee J, Eric Maltbie E, Liu W, Crews FT 2013. Comparison of magnetic resonance imaging in live vs. post mortem rat brains. *PLoS One* 8(8): e71027. doi:10.1371/journal.pone.0071027
- Ohlerth S, Scharf G 2007. Computed tomography in small animals-basic principles and state of the art applications. *Vet J* 173: 254-71.
- Ömerli A, Yılmaz S, Kurtoğlu E, Öztürk M, Ülger H 2013. E.Ü. Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında Tez Çalışmaları. Anatomi Günleri 2013 Konulu Kış Toplantısı 18-20 Ocak 2013, Kayseri, Türkiye.
- Özkadif S 2015. Üç boyutlu rekonstrüksiyon kullanılarak yapılan bazı veteriner anatomik çalışmalar. *Batman Univ J Life Sci* 5(2): 288-295.
- Prokop M 2003. General principles of MDCT. *Eur J Radiol* 45: 4-10.
- Rathjen S, Engelmann R, Struif S, Kaulisch T, Stiller D, Löwel S 2003. The growth of cat cerebral cortex in postnatal life: A magnetic resonance imaging study. *Eur J Neurosci* 18(7): 1797-1806.
- Sahin B, Aslan H, Unal B, Canan S, Bilgic S, Kaplan S ve Tumkaya L 2001. Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological study. *Image Anal Stereol* 20: 9-13.
- Sahin B, Emirzeoglu M, Uzun A, Incesu L, Bek Y, Bilgic S, Kaplan S 2003. Unbiased estimation of liver volume by the Cavalieri principle using magnetic resonance images. *Eur J Radiol* 47: 164-170.
- Schmidt MJ, Amort KH, Failing K, Klingler M, Kramer M, Ondreka N 2014. Comparison of the endocranial- and brain volumes in brachycephalic dogs, mesaticephalic dogs and Cavalier King Charles spaniels in relation to their body weight. *Acta Vet Scand* 56-30.
- Yılmaz O 2018. Three-Dimensional investigation by computed tomography of the forelimb skeleton in van cats. Van Yuzuncu Yil University, Institute of Health Sciences, Faculty of Veterinary, Department of Anatomy, Van, Turkey.



Thermal kinetics and thermodynamics of the dehydration reaction of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$

Fatma Tugce Senberber^{1*} , Emek Moroydor Derun² 

¹Nisantasi University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Civil Engineering, Istanbul, Turkey.

²Yildiz Technical University, Faculty of Chemistry and Metallurgy, Department of Chemical Engineering, Istanbul, Turkey.

*Corresponding author : fatma.senberber@nisantasi.edu.tr; tsenberber@gmail.com
Orcid No: 0000-0002-3257-1524

Received : 25/07/2019
Accepted : 26/07/2019

Abstract: $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ lost its crystal water in the temperature range of 40 - 200°C and the calcined sample was identified as $Mg_3(PO_4)_2$, was a notable for its further treatments in optical and electrical applications. Dehydration process was studied using non-isothermal thermogravimetry (TG) applying model-fitting method. Different mechanism models (chemical reaction order, diffusion and phase interfacial reaction) were applied. The activation energies calculated for the dehydration reaction; and average of activation energy was found as 160 kJ/mol. The better kinetic model of the dehydration reaction for $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ was selected as F3 (chemical reaction - third order). The thermodynamic functions (ΔH , ΔG and ΔS) of the dehydration reaction were calculated by the activated complex theory and found that the process was endothermic, non-spontaneous and fast.

Keywords: Magnesium phosphate, decomposition kinetic, thermal behaviour, thermodynamic

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Chemically bonded phosphate ceramics generally occur with the reaction of a metal cation and phosphate ion. They can be classified according to the metal cation in structure. Although being cementitious materials, magnesium phosphates have similar features and with ceramics. They are quick-setting and hard materials. The phosphate anion in the structure makes the ceramic biocompatible (Yu et al., 2017; Yu and Jiang, 2018). They can be used novel biomaterial designs or can be added to calcium phosphate to increase hardness (Wu et al., 2008). Therefore, magnesium phosphates are preferred in dental and bone restorations, implants, medicine and agriculture (Lu and Chen, 2016; Boonchom, 2009; Qiao et al., 2010; Yang et al., 2000; Rouzic et al., 2017; Kongshaug et al., 2001). Also, this type of phosphate has dissolubility in water, chemical and thermal resistance. This situation makes them useful for anti-corrosive coating and surfaces (Pokorny et al., 2016; Zhang and Tang, 2015).

Magnesium phosphates can be synthesized by chemical precipitation, hydrothermal, solid-state, microwave or biosynthesis methods (Yu et al., 2016; Zhou et al., 2012). Thermal-treated magnesium phosphates can be used as catalyst in organic processes of biomass applications. (Boonchom, 2009; Gopinath et al., 2015; Debnath et al., 2016; Aramendia et al., 1999). The dehydrated forms of magnesium phosphate, $MgHPO_4$ and $Mg_3(PO_4)_2$, are

notable for their dielectric, ferroelectric, piezoelectric and optical features (Assaoudi et al., 2007; Zhang et al., 2016). The chemical structure and textural features of phosphates are notable for these usage areas. For this purpose, the studies on thermal behaviour, thermal decomposition mechanism and thermodynamic functions of ΔH , ΔG and ΔS are important in the manufacturing processes this purpose (Kanazawa et al., 1979; Sadiq et al., 2015; Sadiq et al., 2008). $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$, $MnHPO_4 \cdot H_2O$ and $LiMnPO_4$ are the characterized forms of metal phosphates by thermal kinetic and thermodynamic studies (Boonchom, 2009; Sronsri and Boonchom 2018, Boonchom and Danvirutai 2008).

In this research, it is aimed to explain the mechanism, kinetics and thermodynamics of the decomposition of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ using thermal analyses techniques. Thermal decomposition process of mineral was interpreted by Coats-Redfern non-isothermal kinetic method. The thermal kinetic (E_a , A , n , mechanism and model) and thermodynamic (ΔH , ΔS and ΔG) parameters of the dehydration reaction of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ were determined.

2. Materials and Method

2.1. Mineral preparation and characterization

Hydrates forms of magnesium phosphates can be synthesized in basic hydrothermal conditions (Mousa,

2010). Magnesium source of magnesium oxide (MgO) and phosphorus source of phosphoric acid were reacted under magnetic stirring at room temperature for 1 hour. pH value was determined 10. The prepared white powders were filtered and dried at 40°C.

The sample was identified by X-ray diffraction analysis (XRD). A Philips PANalytical XPert Pro X-ray diffractometer was used at 40 mA, 45 kV and Cu-K α radiation in the 2 θ range of 5°–60°. The vibrational modes of sample were analysed by a PerkinElmer Spectrum One FT-IR with a universal attenuation total reflectance (ATR) sampling accessory with a diamond/ZnSe crystal. Thermal behaviour of sample was studied between the temperature ranges of 30–500°C with a Perkin Elmer Diamond TG/DTG. Five different heating rates (5, 10, 15, and 20°C/min) were applied under the nitrogen atmosphere.

The prepared sample was placed in a Protherm MOS 180/4 high-temperature furnace in nitrogen flowing (5 ml/min) atmosphere. Calcined sample was further analysed by XRD.

2.2. Thermal dehydration kinetics and thermodynamic analysis

Thermal solid-state decomposition in solid-gas system of the single-crystalline compound was given in Equation 1.

For a hydrate mineral, the escaping gas was water and this process was called dehydration.



Thermal behaviour can be explained by using the thermogravimetric data. The activation energy (E_a , kJ/mol), exponential factor (A) and reaction order (n) of dehydration reaction were calculated by using the Coats-Redfern Method. Integrated and linear forms of Coats Redfern were given in Equations 2 and 3. In this method, the E_a and A can be calculated from the slope and intercept of the $\ln[g(\alpha)/T^2]$ vs $1/T$ plot, respectively (Lopez et al., 2015; Boonchom and Puttawong, 2010).

$$g(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d(\alpha)}{f(\alpha)} = \frac{A}{\beta} \int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) dT \quad (2)$$

$$\ln\left(\frac{g(\alpha)}{T^2}\right) = \ln\left(\frac{AR}{E_a\beta}\right) - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

where α is the degree of conversion, $f(\alpha)$ is a function of conversion according to the reaction mechanism, $g(\alpha)$ is a kinetic function of different reaction mechanisms which is obtained from integration of $f(\alpha)$. R is the gas constant (8.314×10^{-3} kJ/mol), T is the absolute temperature, and β is the heating rate (°C/min). The solid-state reaction mechanisms and models were listed in Table 1.

Table 1. Reaction mechanisms, model names and functions of $f(\alpha)$ and $g(\alpha)$

Reaction Mechanism	Model Name	Model Code	$f(\alpha)$	$g(\alpha)$
Chemical reaction order	1 st order	F1	$1-\alpha$	$-\ln(1-\alpha)$
	2 nd order	F2	$(1-\alpha)^2$	$1-(1-\alpha)^2$
	3 rd order	F3	$(1-\alpha)^3$	$(1-(1-\alpha)^3)/2$
Diffusion	One dimensional	F4	$1/2\alpha$	α^2
	Two dimensional	F5	$-(\ln(1-\alpha))^{-1}$	$\alpha+(1-\alpha).\ln(1-\alpha)$
Phase interfacial reaction	Shrinkage geometrical column	F6	$2(1-\alpha)^{1/2}$	$1-(1-\alpha)^{1/2}$
	Shrinkage geometrical spherical	F7	$2(1-\alpha)^{2/3}$	$1-(1-\alpha)^{1/3}$

The thermodynamic factors of enthalpy change (ΔH), Gibbs energy change (ΔG), and entropy change (ΔS) were calculated by using the obtained thermal kinetic parameters of A and E_a for the best-fitted reaction mechanism. The equations used in thermodynamic calculations were given in Equations 4-6 (Naqvi et al., 2018).

$$\Delta H = E_a - RT \quad (4)$$

$$\Delta G = E_a + RT_m \ln\left(\frac{K_B T}{hA}\right) \quad (5)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T_m} \quad (6)$$

where K_B is Boltzmann constant (1.381×10^{-23} m²kg/s²K), T_m is the temperature at which maximum decomposition

occurs (peak point of the DTG curve) and h is the plank constant (6.626×10^{-34} m²kg/s²).

3. Results

3.1. XRD results

XRD patterns of un-calcined and calcined samples were presented in Figure 1. The prepared sample was identified as Magnesium Phosphate Hydrate (Mg₃(PO₄)₂·22H₂O) with the powder diffraction file number of 00-044-0775 (Figure 1a). The magnesium phosphate hydrate was calcined at 500°C. The calcined sample was identified as Farringtonite ((Mg₃(PO₄)₂) with the powder diffraction file number of 00-033-0876 (Figure 1b).

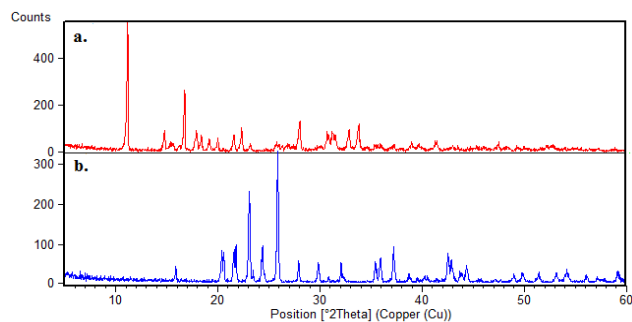


Figure 1. XRD patterns of a. un-calcined and b. calcined samples

3.2. FT-IR results

FT-IR spectrum of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ was presented in Figure 2. The OH^{-1} vibrations in hydrate structure and H-O-H vibrations were seen 3450 cm^{-1} and 1655 cm^{-1} , respectively. The characteristic band values for the PO_4^{3-} was seen at the band value of 1066 cm^{-1} . The band values at the 715 cm^{-1} can be explain with the bending of $PO_2(OH)$. The out of plane of phosphate ion was observed at 578 cm^{-1} .

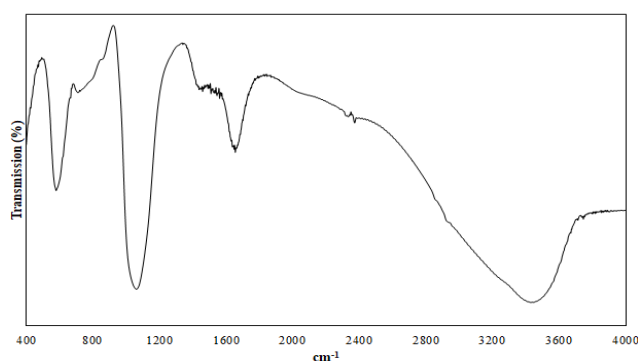


Figure 2. FT-IR spectrum of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$

3.3. Thermal analyses results

Dehydration behaviour of magnesium phosphate hydrate was investigated by using thermal analyses techniques. Thermal analyses result of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ were given Table 2. TG/DTG curves of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ for different heating rates were given in Figure 3. According to the thermal curves, dehydration process occurred in the temperature range of $40\text{--}200^\circ\text{C}$ and mass was determined as approximately %55.5. The peak temperature of DTG curves were seen between 67 and 79°C .

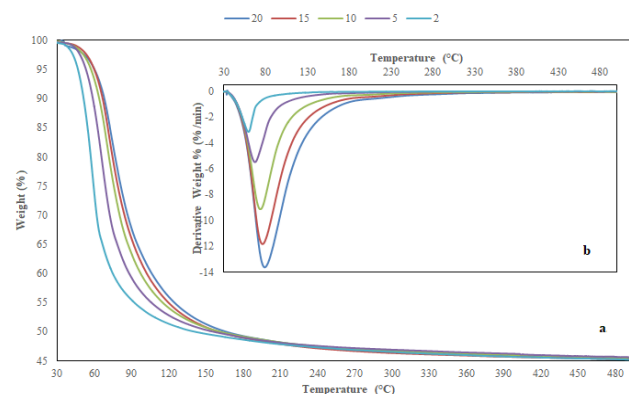


Figure 3. TG/DTG curves of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ a. TG and b. DTG

3.4. Thermal kinetic results

Coast Redfern non-isothermal kinetic method was applied for the calculation of thermal kinetic parameters of E_a and A . Mechanisms of chemical reaction order (F1, F2 and F3), diffusion (F4 and F5) and phase interfacial reaction (F6 and F7) were used in thermal kinetic modelling. The calculated kinetic parameters at the different heating rates were given Table 3.

Correlation factors (R^2) were observed between 0.7882 and 0.9942. The third order of chemical reaction was selected as best fitted mechanism, because of the highest linearity. R^2 values varied between 0.9903 and 0.9942 for reaction model of F3. In this reaction model, the activation energies (E_a) were found in the range of $123.01\text{--}170.97\text{ kJ/mol}$. Exponential factors (A) changed in the range of $1.24 \times 10^{35}\text{--}3.47 \times 10^{18}$ for the F3 model. Thermal kinetic parameters of E_a and A showed a falling tendency with the increasing heating rates, in all models.

3.5. Thermodynamic results

Thermodynamic parameters of ΔH (kJ/mol), ΔG (kJ/mol) and ΔS (kJ/mol \times K) were calculated at different heating rates by using the best-fitted kinetic model (F3) as shown in Table 4. Acceptable differences were observed between the estimated thermodynamic parameters varying heating rates.

ΔH values were found in the range of $120.08\text{--}221.55\text{ kJ/mol}$ thermal dehydration of magnesium phosphate hydrate. ΔG and ΔS values were determined in the range of $82.50\text{--}84.74\text{ kJ/mol}$ and $0.1\text{--}0.248\text{ kJ/mol}\times\text{K}$, respectively.

Table 2. Thermal analyses result of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$

β ($^\circ\text{C}/\text{min}$)	T_{initial} ($^\circ\text{C}$)	T_{final} ($^\circ\text{C}$)	T_{max} ($^\circ\text{C}$) (DTG)	Mass loss (%)
5	46.28	107.76	67.51	55.49
10	48.51	120.12	73.79	55.59
15	50.97	137.56	76.49	55.60
20	52.16	144.98	79.16	55.73

Table 3. Calculated kinetic parameters for Coast Redfern method

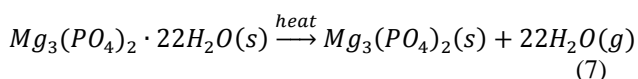
Model Code	β (°C/min)	R ²	E _a (kJ/mol)	A	Model Code	β (°C/min)	R ²	E _a (kJ/mol)	A
F1	5	0.8992	76.04	7.39×10 ¹⁰	F5	5	0.8149	119.13	5.64×10 ¹⁶
	10	0.9065	68.84	6.26×10 ⁹		10	0.8265	109.53	1.56×10 ¹⁵
	15	0.8774	57.26	1.04×10 ⁸		15	0.7899	90.83	1.88×10 ¹²
	20	0.8752	54.15	3.84×10 ⁷		20	0.7882	86.24	3.82×10 ¹¹
F2	5	0.9804	117.73	4.66×10 ¹⁷	F6	5	0.8291	61.28	1.32×10 ⁸
	10	0.9827	105.21	4.67×10 ¹⁵		10	0.8386	55.87	2.32×10 ⁷
	15	0.9716	89.18	1.44×10 ¹³		15	0.7987	45.93	7.16×10 ⁵
	20	0.9706	84.41	2.77×10 ¹²		20	0.7954	43.42	3.33×10 ⁵
F3	5	0.9942	170.97	1.80×10 ²⁶	F7	5	0.8019	115.41	9.14×10 ¹²
	10	0.9926	151.54	1.14×10 ²³		10	0.8156	107.07	6.84×10 ¹⁰
	15	0.9911	129.94	4.19×10 ¹⁹		15	0.7838	89.77	5.25×10 ⁷
	20	0.9903	123.01	3.47×10 ¹⁸		20	0.7836	85.59	3.54×10 ⁶
F4	5	0.8422	136.18	8.14×10 ¹²					
	10	0.8556	126.03	1.30×10 ⁹					
	15	0.8293	107.06	1.92×10 ⁶					
	20	0.8287	101.94	1.85×10 ⁵					

Table 4. Calculated thermodynamic parameters for the best-fitted kinetic model

Model Code	β (°C/min)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol×K)
F3	5	168.14	83.56	0.248
	10	148.65	83.80	0.187
	15	127.03	84.69	0.121
	20	120.08	84.74	0.100

4. Discussion

Removal of 22 moles of crystal water was occurred during the dehydration. In the light of XRD and thermal analyses, the probable reaction for the dehydration process were given in Equation 7.



The differences in calculated activation energies can be explained with the low linearity in correlation and lack of the reaction order in other selected models. Due to the lower linearity for the reaction models of diffusion and phase interfacial (F4 – F7), these models were not suitable for the explanation of reaction model.

Exponential factor (A) was generally associated with the number of times molecules hit in the orientation necessary to cause a reaction (Naqvi et al., 2018). In general, the low and high factors could be explained with the tight and loose complexes, respectively. The thermal dehydration reaction of Mg₃(PO₄)₂·22H₂O may be classified as loose complex, which corresponds to the removal of crystallization water. These results are compatible with thermal analysis, which confirm that the decomposition product as tri-magnesium phosphate anhydrous Mg₃(PO₄)₂.

Positive value of ΔH indicated the propellant power of temperature increase, which meant the endothermic reaction (Boonchom 2008). Positive value of ΔG showed that dehydration process of Mg₃(PO₄)₂·22H₂O was non-spontaneous processes and were necessary to connect with the introduction of heat. The positive value ΔS can be interpreted as the decomposition of a malleable complex which means a fast step (Lopez et al., 2015; Naqvi et al., 2018; Boonchom, 2008).

5. Conclusions

Crystal water of magnesium phosphate hydrate (Mg₃(PO₄)₂·22H₂O) removed by a single step between the temperatures of 40 and 200°C and the heat-treated product was Mg₃(PO₄)₂, significant for its optical and electrical applications. Dehydration process was studied using Coats-Redfern non-isothermal kinetic method and activation energies determined for the different mechanism models. Mechanism models of chemical reaction order (1st, 2nd and 3rd), diffusion (one dimensional and two dimensional) and phase interfacial reaction (shrinkage geometrical column and shrinkage geometrical spherical) were applied. According to the higher linearity in thermal calculations correlation, reaction mechanism can be explained with the 3rd order chemical reaction (F3) for the one-step dehydration reaction of Mg₃(PO₄)₂·22H₂O. The thermodynamic functions (ΔH , ΔG and ΔS) of the dehydration reaction were calculated by the activated complex theory and found that the process was endothermic, non-spontaneous and fast.

Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

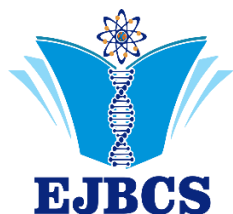
Authors' contributions: F.T.S and E.M.D. contributed to the design and implementation of the research, to the analysis of the results and to the writing of the manuscript.

Conflict of interest disclosure:

The authors have no conflict of interest to study.

References

- Aramendia MA, Borau V, Jimenez C, Marinas JM, Romero FJ 1999. Synthesis and characterization of magnesium phosphates and their catalytic properties in the conversion of 2-hexanol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 217: 288–298.
- Assaoudi H, Fang Z, Butler IS, Ryan DH, Kozinski JA 2007. Characterization of a new magnesium hydrogen orthophosphate salt, $Mg_{3.5}H_2(PO_4)_3$, synthesized in supercritical water. *Solid State Sciences* 9: 385 – 393.
- Boonchom B 2008. Kinetics and Thermodynamic Properties of the Thermal Decomposition of Manganese Dihydrogenphosphate Dihydrate. *Journal of Chemical Engineering Data*, 53: 1533–1538.
- Boonchom B 2009. Kinetic and thermodynamic studies of $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$ by non-isothermal decomposition data. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 98: 863–871.
- Boonchom B, Danvirutai C 2008. A simple synthesis and thermal decomposition kinetics of $MnHPO_4 \cdot H_2O$ rod-like microparticles obtained by spontaneous precipitation route. *Journal Of Optoelectronics And Advanced Materials*, 10(3): 492 – 499.
- Boonchom B, Puttawong S 2010. Thermodynamics and kinetics of the dehydration reaction of $FePO_4 \cdot 2H_2O$, *Physica B*, 405: 2350–2355.
- Debnath S, Saxena SK, Nagabhatla V 2016. Facile synthesis of crystalline nanoporous $Mg_3(PO_4)_2$ and its application to aerobic oxidation of alcohols. *Catalysis Communications* 84: 129–133.
- Gopinath P, Ramalingam V, Breslow R 2015. Magnesium pyrophosphates in enzyme mimics of nucleotide synthases and kinases and in their prebiotic chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 112(39): 12011–12014.
- Kanazawa T, Umegaki T, Shimizu M 1979. The synthesis of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ and its polymorphism. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 52(12): 3713–3717.
- Kongshaug KO, Fjellvag H, Lillerud 2001. The synthesis and crystal structure of a hydrated magnesium phosphate $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$. *Solid State Sciences*, 3: 353–360.
- Lopez FA, Tayibi H, Diaz IG, Alguacil FJ 2015. Thermal dehydration kinetics of phosphogypsum. *Materiales de Construction*, 65(319): 1-14.
- Lu X, Chen B 2016. Experimental study of magnesium phosphate cements modified by metakaolin. *Construction and Building Materials*, 123: 719–726.
- Mousa S 2010. Study on synthesis of magnesium phosphate materials. *Phosphorus Research Bulletin*, 24: 16 – 21.
- Naqvi SR, Tariq R, Hameed Z, Ali I, Naqvi M, Chen WH, Ceylan S, Rashid H, Ahmad J, Taqvi SA, Shahbaz M 2018. Pyrolysis of high ash sewage sludge: kinetics and thermodynamic analysis using Coats-Redfern method, *Renewable Energy*, (*In Press*) doi: 10.1016/j.renene.2018.07.094
- Pokorny P, Tej P, Szelag P 2016. Discussion about magnesium phosphating. *Metalurgija*, 55(3): 507–510.
- Qiao F, Chau CK, Li Z 2010. Property evaluation of magnesium phosphate cement mortar as patch repair material. *Construction and Building Materials*, 24: 695–700.
- Rouziq M, Chaussadent T, Platret G, Stefan L 2017. Mechanisms of k-struvite formation in magnesium phosphate cements. *Cement and Concrete Research*, 91: 117–122.
- Sadiq M, Abdennouri M, Barka N, Baalala M, Lamonier C, Bensitel M 2015. Influence of the Crystal Phase of Magnesium Phosphates Catalysts on the Skeletal Isomerization of 3,3-dimethylbut-1-ene. *Canadian Chemical Transactions*, 3(2): 225–233.
- Sadiq M, Bensitel M, Lamonier C, Leglise J 2008. Influence of the nature of precipitating basic agent on the synthesis of catalytic magnesium phosphate materials. *Solid State Sciences*, 10: 434–437.
- Sronsri C, Boonchom B 2018. Determination of thermokinetic parameters and thermodynamic functions from thermoforming of $LiMnPO_4$. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 134(3): 1575 – 1587.
- Wu F, Wei J, Guo H, Chen F, Hong H, Liu C 2008. Self-setting bioactive calcium–magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 4: 1873–1884.
- Yang Q, Zhu B, Wu X 2000. Characteristics and durability test of magnesium phosphate cement-based material for rapid repair of concrete. *Materials and Structures*, 33: 229–234.
- Yu C, Wu Q, Yang J 2017. Effect of seawater for mixing on properties of potassium magnesium phosphate cement paste. *Construction and Building Materials*, 155: 217–227.
- Yu X, Jiang J 2018. Mineralization and cementing properties of bio-carbonate cement, bio-phosphate cement, and bio-carbonate/phosphate cement: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 21483–21497.
- Yu XN, Qian CX, Sun LZ 2016. Chemosynthesis of nano-magnesium phosphates and its characterization. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 11(4): 1099–1103.
- Zhang S, Li L, Lv X 2016. Synthesis and characterization of a novel $Mg_3(PO_4)_2$ ceramic with low dielectric constant. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, DOI: 10.1007/s10854-016-5703-y
- Zhang Z, Tang W 2015. Tunable Blue–Red Emission and Energy-Transfer Properties of $Mg_3(PO_4)_2:Eu^{2+},Mn^{2+}$ Phosphors. *Euroopen Journal of Inorganic Chemistry*, 2015: 3940–3948.
- Zhou H, Luchini TJF, Bhaduri SB 2012. Microwave assisted synthesis of amorphous magnesium phosphate nanospheres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23:2831–2837.



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

Taner Sar¹ , Meltem Yesilcimen Akbas^{1*} 

¹ Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University, Gebze-Kocaeli, Turkey

*Corresponding author : akbas@gtu.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-2369-9638>

Received : 26/07/2019
Accepted : 23/09/2019

Abstract: Biofilm formations of 25 *S. aureus* strains were investigated on microtitration plates using TSB and TSB media supplemented with glucose (0.25%, 1.0%, or 2.0%, w/v) for 48 hours. The biofilm formations of *S. aureus* isolates incubated in TSB were generally found to be moderate (84%). Majority of strong biofilm formations (84-96%) were determined by *S. aureus* strains incubated in the presence of glucose. It was shown that the presence of glucose had positive effect on *S. aureus* biofilm formations.

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

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococci are the most important pathogens causing major problems in food industry (Tauxe, 2002). The predominant *Staphylococcus* species are *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* and *S. aureus* (Otto, 2013; Becker et al., 2014; Méric et al., 2015). Especially *S. aureus* is known as the third common cause of foodborne illness worldwide (Aydin et al., 2011). *S. aureus* can be easily isolated from surfaces in the food and dairy industries (Ateba et al., 2010; Santos et al., 2014). The products can also be contaminated during food processing by *S. aureus* enterotoxins that cause foodborne illnesses (Cha et al., 2006; Sudagidan and Aydin, 2009). Moreover, *S. aureus* strains create biofilms on different types of surfaces such as stainless steel, plastic, glass, and rubber (Akbas and Kokumer, 2015; Lee et al., 2014, 2016, 2017; Unlu et al., 2018).

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

2. Materials and Method

2.1. Bacterial strains

In this work, 25 *S. aureus* isolates (S1-S25) were evaluated for their biofilm formation abilities in TSB (Tryptic soy broth) or TSB_{Glc} (TSB enriched with D-glucose) media. *S. aureus* strains ATCC 25923 and ATCC 29213 were used as biofilm positive and biofilm negative strains, respectively.

2.2. Biofilm Formation

For determining the biofilm formations, TSB and TSB_{Glc} (TSB enriched with D-glucose at different concentrations, 0.25% TSB_{Glc0.25}; 1.0% TSB_{Glc1} and 2.0% TSB_{Glc2}; w/v) media were used. The isolates and reference strains were incubated overnight at 37°C in TSB. Following the incubation, the cultures were diluted at a rate of 1:100 in fresh TSB or TSB_{Glc} media. The cultures were transferred into flat-bottomed 96-well polystyrene microtitration plates (150µL; about 10⁵cfu/mL, final concentration) and incubated at 37°C for 48 h. At the end of the incubation, bacterial cells were removed and then the wells were stained with crystal violet solution (0.5% w/v, Sigma, St. Louis, MO, USA) for 20 min. Then, the wells were decanted and treated with glacial acetic acid (33% v/v, Merck) for 10 min. All samples were transferred into a new microtitration plate wells and measured at 570 nm using an ELISA plate reader (Christensen et al., 1985). The absorbance values of TSB or TSB supplemented with D-glucose (OD_c) were used as a blank. Each experiment was performed in triplicate for all isolates.

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

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

3. Results

In this study, 25 *S. aureus* isolates (S1-S25) and 2 reference strains (ATCC 25923 and ATCC 29213) were used for determination of biofilm formations. The negative reference *S. aureus* ATCC 29213 and the positive reference strain *S. aureus* ATCC 25923 were shown as non and strong biofilm producers in the all media, respectively (Table 1). In addition, S3 and S4 were considered as strong biofilm producers (Table 1).

In general, 21 of 25 *S. aureus* isolates (84%) were considered as moderate biofilm producers when they were

incubated in TSB medium (Table 2). The biofilm formation capacities of strains gradually increased by increasing concentrations of glucose in TSB media supplemented with glucose. 24 of 25 *S. aureus* isolates (96%) cultured in TSB_{Glc2} media were determined as strong biofilm producers (Table 2).

According to obtained results, it was shown that the content of media was important parameter for biofilm productions. For this reason, the effects of media components should be investigated in more detail for biofilm formation studies.

Table 1. Biofilm formations (OD_{570nm}) of *S. aureus* strains on TSB and TSB_{Glc} (TSB_{Glc0.25}, TSB_{Glc1}, and TSB_{Glc2}) media on microtitration plates after 48 hours. OD, optical density; standard deviations are in parentheses.

Strain	Media			
	TSB	TSB _{Glc0.25}	TSB _{Glc1}	TSB _{Glc2}
S1	0.42 (0.00)	0.88 (0.01)	1.25 (0.02)	1.09 (0.04)
S2	0.46 (0.02)	0.52 (0.15)	0.77 (0.21)	0.69 (0.00)
S3	0.99 (0.20)	1.51 (0.04)	1.49 (0.05)	1.52 (0.04)
S4	0.57 (0.07)	0.76 (0.09)	1.32 (0.01)	1.16 (0.17)
S5	0.43 (0.06)	0.98 (0.07)	1.36 (0.00)	1.31 (0.02)
S6	0.39 (0.11)	0.87 (0.12)	0.87 (0.12)	0.97 (0.01)
S7	0.64 (0.17)	0.70 (0.00)	0.77 (0.23)	0.91 (0.10)
S8	0.31 (0.04)	0.80 (0.04)	0.75 (0.03)	0.82 (0.23)
S9	0.57 (0.03)	0.94 (0.02)	1.26 (0.01)	1.23 (0.15)
S10	0.56 (0.11)	1.03 (0.09)	1.08 (0.04)	1.31 (0.01)
S11	0.55 (0.04)	1.03 (0.10)	0.99 (0.07)	1.16 (0.10)
S12	0.69 (0.02)	0.94 (0.10)	1.60 (0.15)	1.72 (0.23)
S13	0.63 (0.09)	0.89 (0.08)	0.84 (0.00)	0.93 (0.04)
S14	1.13 (0.11)	1.54 (0.05)	1.16 (0.06)	1.64 (0.18)
S15	0.63 (0.01)	0.89 (0.13)	0.94 (0.12)	0.93 (0.05)
S16	0.78 (0.13)	0.97 (0.10)	1.15 (0.39)	1.08 (0.00)
S17	0.50 (0.08)	1.00 (0.00)	1.13 (0.18)	0.97 (0.10)
S18	0.49 (0.05)	0.86 (0.08)	1.06 (0.05)	1.13 (0.08)
S19	0.50 (0.05)	0.99 (0.05)	0.92 (0.12)	1.16 (0.11)
S20	0.62 (0.09)	1.03 (0.07)	0.96 (0.10)	0.90 (0.36)
S21	0.79 (0.10)	1.02 (0.00)	0.94 (0.12)	1.11 (0.01)
S22	0.60 (0.10)	1.05 (0.01)	1.22 (0.04)	1.09 (0.02)
S23	0.51 (0.06)	1.05 (0.06)	1.01 (0.19)	0.98 (0.18)
S24	0.69 (0.19)	0.91 (0.05)	1.10 (0.02)	0.95 (0.00)
S25	0.47 (0.00)	0.98 (0.01)	1.14 (0.14)	1.02 (0.12)
ATCC 29213	0.22 (0.04)	0.25 (0.03)	0.26 (0.04)	0.28 (0.07)
ATCC 25923	1.18 (0.19)	1.04 (0.06)	1.46 (0.05)	1.45 (0.00)

Table 2. The biofilm formations of *S.aureus* isolates (n) with different types of TSB media (TSB, TSB_{Glc0.25}, TSB_{Glc1} and TSB_{Glc2}) on microtitration plates after 48 hours.

	<i>S.aureus</i> (n)			
	TSB	TSB _{Glc0.25}	TSB _{Glc1}	TSB _{Glc2}
Nonbiofilm (-)	-	-	-	-
Weak (+)	2	-	-	-
Moderate (++)	21	4	3	1
Strong (+++)	2	21	22	24

4. Discussion

In this study it was shown that *S. aureus* strains could produce moderate biofilm formations in the TSB, or strong biofilms in TSB supplemented with glucose. The obtained results were consistent with previous studies (Stepanovic et al., 2000; Rode et al., 2007; Manandhar et al., 2018). The environmental factors including the presence of glucose, or salt, temperature, and pH could be effective on the biofilm formations (Michu et al., 2011; Khangholi and Jamalli, 2016; Kyoui et al., 2016).

Biofilm formations on a solid surface also depends on the type of the surface materials (Jo et al., 2010). Generally, glass and stainless steel are described as hydrophilic materials while rubber and plastic are assumed as hydrophobic materials (Sinde and Carballo, 2000; Donlan and Costerton, 2002). The biofilm formations were found to be higher on hydrophobic surfaces than on hydrophilic surfaces (Simões et al., 2008). In this study, *S.aureus* isolates produced biofilms on hydrophobic polystyrene microtitration plates. Therefore, the biofilm formation of *S.aureus* isolates should also be assessed on various surfaces such as stainless steel, glass, or polypropylene in the presence of different media supplements.

5. Conclusions

In this work, the biofilm formations of 25 *S.aureus* isolates and 2 biofilm reference *S.aureus* strains were investigated by using TSB and TSB_{Glc} media on microtitration plates. When *S.aureus* isolates were cultured in the TSB media, 21 of 25 isolates (84%) produced moderate biofilm formations. On the other hand, nearly all of isolates (96%) cultivated in TSB supplemented with glucose produced strong biofilm formations. According to these results, it can be concluded that presence of glucose is an important factor for *S.aureus* biofilm formations.

Acknowledgements

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

Authors' contributions:

Taner Sar: Performed the experiment, analyzed data, and wrote the manuscript.

Meltem Yesilcimen Akbas: Analyzed data, supervised the experiment's progress, and wrote the manuscript.

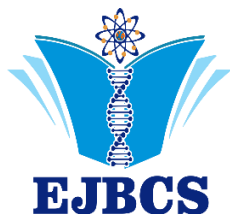
Conflict of interest disclosure:

There are no ethical issues after the publication of this manuscript.

References

- Akbas MY, Kokumer T 2015. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. *J Food Sci Technol*, 50(7): 1666-1672.
- Ateba CN, Mbewe M, Moneoang MS, Bezuidenhout CC 2010. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng Area, North West province, South Africa. *S Afr J Sci*, 106(11-12): 1-6.
- Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *Int J Food Microbiol*, 148(2): 99-106.
- Becker K, Heilmann C, Peters G 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 27(4): 870-926.
- Bonsaglia ECR, Silva NCC, Júnior AF, Júnior JA, Tsunemi MH, Rall VLM 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35(1): 386-391.
- Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, Lee YS 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J Appl Microbiol*, 101(4): 864-871.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, 22(6): 996-1006.
- Donlan RM, Costerton JW 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15(2): 167-193.
- Flemming HC, Wingender J 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9): 623.
- Jo SH, Baek SB, Ha JH, Ha SD 2010. Maturation and survival of *Cronobacter* biofilms on silicone, polycarbonate, and stainless steel after UV light and ethanol immersion treatments. *J Food Prot*, 73(5): 952-956.

- Khangholi M, Jamali A 2016. The effects of sugars on the biofilm formation of *Escherichia coli* 185p on stainless steel and polyethylene terephthalate surfaces in a laboratory model. Jundishapur J Microbiol, 9(9): e40137.
- Koutina G, Skibsted LH 2015. Calcium and phosphorus equilibria during acidification of skim milk at elevated temperature. Int Dairy J, 45: 1-7.
- Kyoui D, Hirokawa E, Takahashi H, Kuda T, Kimura B 2016. Effect of glucose on *Listeria monocytogenes* biofilm formation, and assessment of the biofilm's sanitation tolerance. Biofouling, 32(7): 815-826.
- Lee SHI, Barancelli GV, Camargo TM, Corassin CH, Rosim RE, Cruz AG, Cappato LP and Oliveira CA 2017. Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. Food Res Int, 91: 88-91.
- Lee SHI, Cappato LP, Corassin CH, Cruz AG, Oliveira CAF 2016. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. J Dairy Sci, 99: 2384-2390.
- Lee SH, Mangolin BL, Gonçalves JL, Neeff DV, Silva MP, Cruz AG, Oliveira CA 2014. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. J Dairy Sci, 97:1812-1816.
- Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N 2018. Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by Staphylococcal clinical isolates. BMC Res Notes, 11(1): 714.
- Méric G, Miragaia M, de Been M, Yahara K, Pascoe B, Mageiros L, Mikhail J, Harris LG, Wilkinson TS, Rolo J, Lambie S, Bray JE, Jolley KA, Hanage WP, Bowden R, Maiden MCJ, Mack D, de Lencastre H, Feil EJ, Corander J, Sheppard SK 2015. Ecological overlap and horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Genome Biol Evol, 7(5): 1313-1328.
- Michu E, Cervinkova D, Babak V, Kyrova K, Jaglic Z 2011. Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of ica-mediated biofilms. Int Dairy J, 21(3): 179-184.
- Otto M 2013. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection. Bioessays, 35(1): 4-11.
- Rode TM, Langsrud S, Holck A, Møretø T 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. Int J Food Microbiol, 116(3): 372-383.
- Santos VM, Martins HB, Rezende IS, Barbosa MS, Andrade EF, Souza SG, Campos GB, Oliveira PS, Sousa DS, da Silva DCC, Amorim AT, Timenetsky J, Cruz MP, Yatsuda R, Marques LM 2014. Virulence factor profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk from Brazil. Food Nutr Sci, 5(15): 1496-1505.
- Simões M, Simões LC, Cleto S, Pereira MO, Vieira MJ 2008. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. Int J Food Microbiol, 121(3): 335-341.
- Sinde E, Carballo J 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiol, 17(4): 439-447.
- Stepanović S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods, 40: 175-179.
- Sudagidan M, Aydin A 2009. Screening virulence properties of staphylococci isolated from meat and meat products. Wien Tierärztl Monat, 96: 128-134.
- Tauxe RV 2002. Emerging foodborne pathogens. Int J Food Microbiol, 78(1-2): 31-41.
- Unlu A, Sar T, Seker G, Erman AG, Kalpar E, Akbas MY 2018. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains and their control by selected phytochemicals. Int J Dairy Tech, 71(3): 637-646.



Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.org.tr/ejbcs



Single cell level microalgal green synthesis of silver nanoparticles: Confocal microscopy and digital image analysis

Betül YILMAZ ÖZTÜRK^{1*}, Derviş ÖZTÜRK²

^{1*} Eskişehir Osmangazi University, Center Research Laboratory Application and Research Center (ARUM), Eskişehir, Turkey
²Eskişehir Osmangazi University, Mahmudiye Horse Vocational School, Department of Plant and Animal Production, Eskişehir, Turkey

*Corresponding author : byozturk@ogu.edu.tr
Orcid No: <http://orcid.org/0000-0002-1817-8240>

Received : 31/07/2019
Accepted : 12/10/2019

Abstract: Nanoparticles are attracting increasing attention due to their unusual and fascinating properties, which are strongly influenced by their size, morphology and structure. Among the developed nanoparticles, silver (Ag) nanoparticles are pertaining to have a wide range of application in the fields of physical, chemical and biological science. Physical and chemical methods are used to synthesize such nanomaterials, among the various known synthesis methods, biosynthesis of silver nanoparticles is preferred as it is environmentally safe, low cost and less toxic. In particular, the synthesis of nanoparticles in the cell can be achieved in a standard size and shape. In the present work, the coccoid green algae *Chodatodesmus mucronulatus* was used as a reducing agent for the synthesis of intracellular nanostructure silver particles (Ag-NPs). Algae are with autofluorescence characteristics. These properties are known to be due to chlorophyll pigments. In this context, a confocal laser scanning microscopy (CLSM) based method to assess to show that the amount of chlorophyll decreases at microalgae is reported.). During this process, changes in the amount of chlorophyll *a*, *b* and carotenoid of the *Chodatodesmus mucronulatus* were examined at 24 hours using UV-Vis spectrophotometer for 3 days. As a result, the amount of carotenoid, especially with the onset of the reaction, decreased markedly. After 72 hours of reaction, the amount of carotenoid decreased from 6,54 $\mu\text{g ml}^{-1}$ to 0,00 $\mu\text{g / ml}$, chlorophyll *a* decreased 24,46 $\mu\text{g ml}^{-1}$ to 0,06 $\mu\text{g ml}^{-1}$, chlorophyll *b* decreased from 11,33 $\mu\text{g ml}^{-1}$ to 4,15 $\mu\text{g / ml}$. This change (pigment amount in cells) was also observed with a confocal microscope every 24 hours. Using this technique, the effect of in-use concentrations of chlorophyll autofluorescence was defined. Determination of mean fluorescence intensity (MFI) per cell by collecting auto-fluorescence from single cells in *x*, *y* and *z* dimensions permitted evaluation at single-cell level. According to the results, there is a decrease in the amount of pigment in the cell. This suggests that the pigments may be capping agents and trigger nanoparticle synthesis.

Keywords: Microalgae, Chlorophyll, Confocal microscopy, Nanoparticle, Silver

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Bionanotechnology has emerged as the integration between biotechnology and nanotechnology for the synthesis of nanomaterials. Nanoparticles are the leading nanomaterials. It has attracted further attention of researchers, especially due to the adjustable hydrophilic-hydrophobic balance and target-specific localization properties of nanoparticles (Salem et al., 2016; Shankar et al., 2016). Especially, biologically synthesized nanoparticles have attracted great interest in biology and medicine because of their unique particle size and shape-dependent physical, chemical and biological properties. (Sun et al., 2008; Ko et al., 2007). Elemental silver and silver salts have the potential to kill pathogens and have also been used as a disinfectant in health care, even before the emergence of synthetically produced organic drugs such as penicillin. (Williams et al., 1999). In recent years, silver nanoparticles (AgNPs), synthesized as nanomaterials, have received great attention

due to the beneficial properties of antimicrobial, antioxidant and antitumor activities that help in the development of pharmaceutical drugs. (Ramkumar et al., 2017). AgNPs have been successfully applied in the food industry, textile industry and agriculture (Gomaa, 2017). The synthesis of AgNPs is carried out by quite different methods. For example, chemical reduction, photoreduction, thermal decomposition, ultrasound, microwave irradiation and electrochemical methods are used (Venugopal et al., 2017). However, in recent years, the green synthesis method has been used to prevent the toxicity of the process and increase the yield. Various organisms (bacteria, fungi, algae and plants) can be used for these processes. Stabilization and shape of nanoparticles are organic materials found in organisms. Among the biological systems, microalgae have very high potential for the production of nanoparticles by taking metal ions during the detoxification process. Compared to plants, microalgae can replicate their biomass with minimum requirements for sunlight, atmospheric

carbon dioxide and mineral salts. Microalgae performs synthesis of nanoparticles in less time (Agarwal et al., 2019). At the same time, both live and dry algae biomass can be used in biosynthesis. However, there are deficiencies in the literature about which mechanism or organic material takes part in the synthesis of these nanoparticles. The aim of this study was to synthesize green intracellular (intracellular) AgNPs and characterize them with TEM and UV-Vis. In addition to describing the mechanism of production of macromolecules (such as pigments), which are responsible for the biosynthesis of nanoparticles, to prove the production mechanism of possible nanoparticles in biological model systems. Therefore, especially in our study, changes in the amount of pigment were observed by extraction. The pigments were also monitored by UV-Vis spectrophotometric analysis. In addition, with Confocal laser scanning microscopy (CLSM) using fluorescence characteristics, mean fluorescence intensity (MFI) analysis was followed and supported by quantitative results using Image J.

2. Materials and Method

2.1. Organism

The organism we used in our study is *Chodatodesmus mucronulatus* (Chodat) Hegewald, Bock & Krienitz which belongs to the group of Chlorophyta which is coccoid green algae. These algae were grown in BG-11 medium for 15-20 days under 3000 lux light at 28 ° C. When algae passed the log phase phase, the cells were centrifuged at 4000 rpm and biomass was obtained. All chemicals used in this study were analytical quality.

2.2. Intracellular AgNP synthesis

Silver nitrate was used for the stock solution. This solution was adjusted to 5 mM in BG-11 medium. The algal suspension was incubated at 28 ° C for 72 hours. Thus, the synthesis of intracellular AgNPs from living algae cells was completed. After the reaction, the biomass was separated by centrifugation and stored at -20 ° C until characterization.

2.3. Spectroscopic characterization of silver nanoparticles

The reduction of silver ions was monitored by measuring the absorbance scan at 190-1100 nm at selected time intervals by UV-Vis spectrophotometer. Color change was observed in silver nitrate solution incubated with *Chodatodesmus mucronulatus* cell-free extract. Silver nanoparticles dispersed in water were kept at room temperature.

2.4. Transmission Electron Microscopy (TEM) characterization of silver nanoparticles

The TEM sample of silver nanoparticles synthesized using coccoid green algae were prepared by placing drop of the reaction mixture over carbon coated copper grids and allowing the to evaporate. TEM micrographs of the sample

were taken using JEOL JEM 1220 (Tokyo, Japan) operated at an accelerating voltage of 100 kV .

2.5. Spectroscopic characterization of pigment amount

The UV-Vis spectrum was also used for the quantity analysis of the pigments. Pigments were measured by methanol extraction every 24 hours (Jiang et al. 2015). After exposure to chlorophyll and carotenoid extraction AgNO₃, the cells were centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes at 4000 rpm. 3 mL of methanol was added to the resulting biomass and mixed well. The tube was then incubated for 24 hours in the dark and at 45 ° C. The solution was then centrifuged at 9000 x g for 10 minutes and the absorbance of the supernatant was measured at a UV Visible spectrophotometer (Double Beam UV-Spectrophotometer in Spectrophotometer, China) at 470 nm, 652.4 nm and 665.2 nm wavelengths. Pigment amounts were calculated according to report of Yu (Yu et al., 2018).

2.6. Confocal microscopy analysis

Chodatodesmus mucronulatus was cultured in silver nitrate solution for 72 hours. The algae were then washed twice with ddH₂O in the dark. The fluorescence scan was performed between 400 and 700 nm per 50 nm emission. Images were obtained by confocal laser scanning microscopy LSM 800 (ZEISS, Germany).

2.7. Digital Image Analysis

Digital image analysis was performed using Image 1.29 (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). For mean fluorescence intensity (MFI) analysis, all images were obtained using the same CLSM settings. All data were obtained from xy confocal slices of the image to determine MFI in a two-dimensional image. Confocal segments were obtained using Zeiss confocal software for MFI. These data were used to determine the MFI per cell of *Chodatodesmus mucronulatus* using Image J.

3. Results

Various approaches have been applied to achieve a better synthesis of silver nanoparticles such as physical, chemical and biological methods. Recently, the synthesis of silver nanoparticles using the living thing directly (intracellular) has become more popular because it is environmentally friendly (Li et al., 2007; Song et al., 2009). The colorless solution of AgNO₃ turned dark brownish yellow, indicating the formation of silver nanoparticles. The formation of silver nanoparticles was monitored by UV-Vis absorption spectra at 190 to 1100 nm; where a dense band was clearly detected at 430 nm (Figure 1). This band was defined as the "surface plasmon resonance band" and was connected to the excitation of free electrons in the nanoparticles. The shape of the band was symmetrical, suggesting a homogeneous distribution of spherically shaped nanoparticles (Travan et al., 2009).

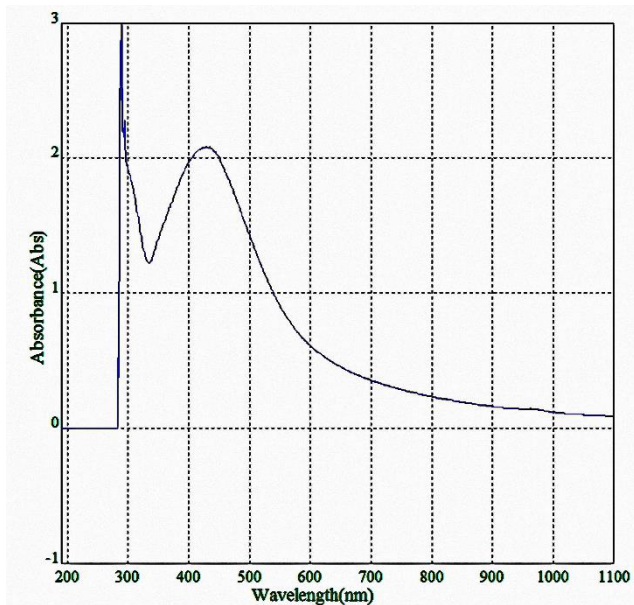


Figure 1. UV-Vis absorption spectrum of silver nanoparticles synthesized by treating 5mM aqueous AgNO₃ solution with *Chodatodesmus mucronulatus*

Silver nanoparticle size, morphology and distribution were analyzed by TEM. The nanoparticle size is about 20-40 nm Figure 2. A similar result Öztürk (2019), was obtained as a result of intracellular synthesis of *Desmodemus* sp. cells. In Barwal et al.,2011 Intracellular silver nanoparticle was synthesized with *Chlamydomonas reinhardtii* intracellular nanoparticle of 5-35 nm.

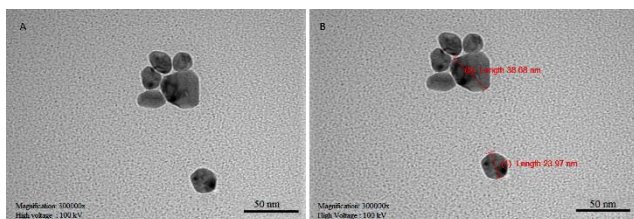


Figure 2. Morphological characterization of the silver nanoparticles. A, B TEM Image of *Chodatodesmus mucronulatus* cell mediated synthesized silver nanoparticles.

3.1. Spectroscopic characterization of pigment amount

Cells were observed for 72 hours by exposure to silver nitrate. Extraction was performed every 24 hours to measure the amount of pigments. The solutions obtained by extraction were read at 470 nm, 652.4 nm and 665.2 UV-Vis. After 72 hours of reaction, the amount of carotenoid decreased from 6,54 µg ml⁻¹ to 0,00 µg / ml, chlorophyll *a* decreased 24,46 µg ml⁻¹ to 0,06 µg ml⁻¹, chlorophyll *b* decreased from 11,33 µg ml⁻¹ to 4,15 µg /ml (Figure 3). According to these results, the most affected group was carotenoid. Carotenoids had been depleted as soon as they were exposed to silver nitrate. The next group was chlorophyll a. According to these results, the formation and formation of silver nanoparticles were first thought to be effective carotenoids.

3.2. Confocal microscopy analysis and Digital Image Analysis

Phototrophic organisms are automatic fluorescence relative to their pigments and allow non-invasive in situ analysis without external fluorescence labeling or staining (Neu and Lawrence, 1997). Recently, cellular fluorescence collection techniques from single-cell phototrophic organisms for phylogenetic identification have been reported (Roldan et al., 2004). Confocal laser scanning microscopy (CLSM) allows the quantitative assessment of the fluorescence properties of algal cells in situ, as well as the advantage that visualization and quantization are possible at the single-cell level (Neu and Lawrence, 1997). In our study, laser scanning confocal microscopy was used to make the pigment change of autofluorescent algae cells visible. So, during intracellular synthesis of silver nanoparticle from *Chodatodesmus mucronulatus*, pigment changes were observed by laser scanning confocal microscopy that *Chodatodesmus mucronulatus* pigments due to its autofluorescent property. The pigment change in this microscope is understood by reducing the fluorescence property. We performed a wide wavelength scan during the procedure. The initiation of silver nanoparticle synthesis within the cell and continued in parallel with pigment change was also visualized by confocal microscopy (Figure 4).

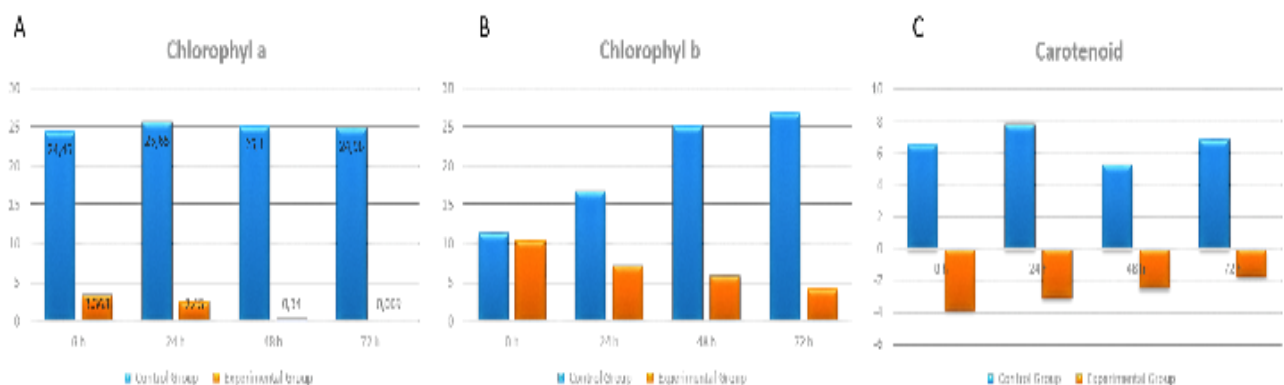


Figure 3. Amount of pigments (Chl-a, Chl-b, Carotenoids) during synthesis of intracellular silver nanoparticles in *Chodatodesmus mucronulatus*

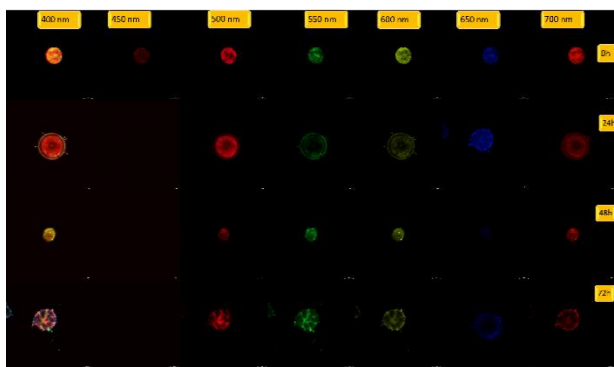


Figure 4. Laser scanning confocal microscopy image for pigment changes of *Chodatodesmus mucronulatus*

During nanoparticle formation, changes in autofluorescence radiation of living algae cells were visualized and digital image analysis was performed. In addition, in order to determine the chlorophyll autofluorescence, the regions of maximum intensity on the XY slides were observed as two-dimensional images and the mean fluorescence intensity (MFI) value was determined. Our results showed a decrease in fluorescence intensity caused by the synthesis of AgNPs. The mean MFI calculated from individual cells decreased over time and quantitative analysis is shown in Figure 5. The data clearly show that the decrease in chlorophyll fluorescence is dependent on the AgNO₃ exposure time.

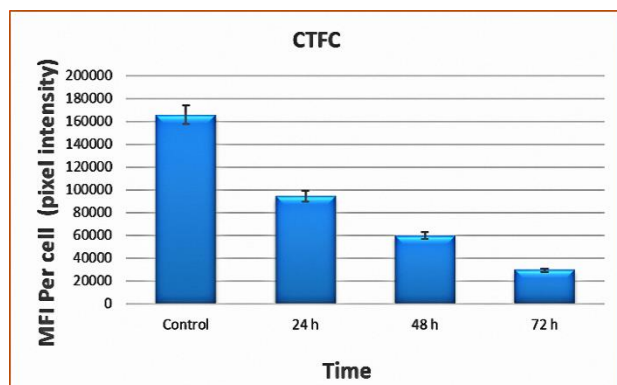


Figure 5. Mean fluorescence intensity after 0h, 24h, 48h, and 72h of contact time and subsequent transfer to fresh medium (error bars represent (±SD). *CTFC: Corrected total cell fluorescence

4. Discussion

It is an alternative method developed to synthesize metal nanoparticles by using green synthesis method which living organisms or using extracts from organisms. This method, unlike other methods (especially chemical method), is an environmentally friendly process. Algae, bacteria, fungi and plants can be used in this process and nanoparticles can be synthesized without the need for additional reducing and stabilizing agents. Among these groups of organisms, microalgae are thought to have very high potential for the production of nanoparticles due to their reduction properties of metals (Jena et al., 2014; Khatami et al., 2019). Synthesis of nanoparticles can be achieved in a short time with the use of algae. On the other hand, nanoparticle synthesis can be

performed using both live and dry algae biomass (Dağlıoğlu and Öztürk, 2019; Öztürk, 2019).

It is generally accepted that UV-Vis spectroscopy can be used to examine the size and shape of nanoparticles in aqueous suspensions (Dubey et al., 2009). In this spectroscopic analysis, peaks around 420 indicate the formation of the Surface Plasmon Resonance (SPR) band. This band was clearly seen in our study and it was found to be compatible with the other studies reported. For example, Khatami and Pourseyedi (2015) are reported, silver nanoparticles were obtained by using *Phoenix dactylifera* (date palm) pit aqueous extract and SPR was formed at 428 nm wavelength. Jegadeeswaran et al., (2012) are reported, the absorption spectra of AgNPs obtained from *Padina tetrastrum* were found to have absorbance peaks at 426 nm.

Phototrophic organisms are autofluorescent due to their pigments and can realize irradiate without further fluorescence labeling (Neu and Lawrence 1997). In this study, cell contents were determined using fluorescent emission with microalgae natural autofluorescent compounds. Therefore, microscopic fluorescence images of *Chla* are also useful for understanding the photochemical functions and thylacoid membrane structures of algae cells and chloroplasts (Harter et al. 2012; Sarafis 1998). CLSM is widely used in biomedical and bioscience research (Chandler and Volz 2004; Halhuber and König 2003). CLSM allows rapid and multiple parametric analyzes of microalgal chlorophyll autofluorescence, and MFI analysis supports quantitative results using Image J (Nancharaiyah et al. 2007). Possible participation of various macromolecules in Barwal et al., (2011) study the reduction of silver ion to silver nanoparticles has not yet been reported. The identification of macromolecules responsible for the biosynthesis of SNPs reported that it would describe the production mechanism of possible SNPs in biological model systems. Based on this idea, the mechanism of action during the synthesis of silver nanoparticles in microalgae was thought to be pigments and the results of this study were compared with UV-Vis and Confocal Microscopy and it was found to support this idea. *Desmodesmus* sp. algae were used in a similar study and similar results were reported (Dağlıoğlu and Öztürk, 2019). With the green synthesis method, the effect of macromolecules which are effective during the synthesis of silver nanoparticles should be investigated in more depth.

5. Conclusions

In conclusion, this study describes the intracellular synthesis of silver nanoparticles using microalgae. The formation of silver nanoparticles was confirmed by UV-spectroscopy and TEM. Spherical shape was observed using TEM. The resulting nanoparticles were very small in size (20 to 40 nm). The autofluorescence properties of intracellular silver nanoparticles were monitored by laser scanning confocal microscopy and it was observed that the resulting nanoparticles had a significant effect of pigments as reducing agents.

Acknowledgements

This work was studied at Eskisehir Osmangazi University Central Research Laboratory Application and Research Center (ARUM).

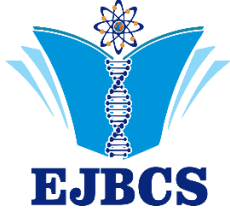
Authors' contributions: All authors studied each analysis in this research paper. B.Y.Ö and D.Ö did the literature review and the D.Ö made the arrangements of the figure. B.Y.Ö wrote the entire article in English.

Conflict of interest disclosure:

Authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Agarwal P, Gupta R, Agarwal N 2019. Advances in Synthesis and Applications of Microalgal Nanoparticles for Wastewater Treatment. *J Nanotechnol*, 2019:1-9.
- Barwal I, Ranjan P, Kateriya S, Yadav SC 2011. Cellular oxidoreductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *J nanobiotechnology*, 9(1): 56.
- Chandler GT, Volz DC 2004. Semiquantitative confocal laser scanning microscopy applied to marine invertebrate ecotoxicology. *Mar Biotechnol*, 6:128–137.
- Dağlıoğlu Y, Öztürk BY 2019. A novel intracellular synthesis of silver nanoparticles using *Desmodesmus* sp.(Scenedesmeceae): different methods of pigment change. *Rend. Lincei Sci. Fis. Nat.*, 1-11.
- Dubey M, Bhaduria S, Kushwah B 2009. Green synthesis of nanosilver particles from extract of *Eucalyptus hybrida* (safeda) leaf. *Dig J Nanomater Biostruct*, 4:537–543.
- Gomaa EZ 2017. Antimicrobial, antioxidant and antitumor activities of silver nanoparticles synthesized by *Allium cepa* extract: a green approach. *J Genet Eng Biotechnol*, 15(1): 49-57.
- Halbhuber K-J, König K 2003. Modern laser scanning microscopy in biology, biotechnology and medicine. *Ann Anat Anat Anz*, 185:1–20.
- Harter K, Meixner AJ, Schleifenbaum F 2012. Spectromicroscopy of living plant cells. *Mol Plant*, 5:14–26.
- Jegadeeswaran P, Shivaraj R, Venkatesh R 2012. Green synthesis of silver nanoparticles from extract of *Padina tetrastromatica* leaf. *Dig J Nanomater Bios*, 7(3): 991-998.
- Jena J, Pradhan N, Nayak RR, Dash BP, Sukla LB, Panda PK, Mishra BK 2014. Microalga *Scenedesmus* sp.: a potential low-cost green machine for silver nanoparticle synthesis. *J Microbiol Biotechnol*, 24:522–533.
- Khatami M, Pourseyedi S 2015. *Phoenix dactylifera* (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable silver nanoparticles with high antifungal and antibacterial activity. *IET Nanobiotechnol.*, 9(4): 184-190.
- Khatami M, Varma RS, Heydari M, Peydayesh M, Sedighi A, Agha Askari H, Rohani M, Baniasadi M, Arkia S, Seyedi F, Khatami, S. 2019. Copper Oxide Nanoparticles Greener Synthesis Using Tea and its Antifungal Efficiency on *Fusarium solani*. *Geomicrobiol. J.*, 1-5.
- Ko SH, Park I, Pan H, Grigoropoulos CP, Pisano AP, Luscombe CK, Frechet JMJ 2007. Direct nanoimprinting of metal nanoparticles for nanoscale electronics fabrication. *Nano Lett*, 7: 1869-1877.
- Li S, Shen Y, Xie A, Yu X, Qiu L, Zhang L, Zhang Q 2007. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chem.*, 9: 852-858.
- Nancharaiyah YV, Rajadurai M, Venugopalan VP (2007) Single cell level microalgal ecotoxicity assessment by confocal microscopy and digital image analysis. *Environ Sci Technol*, 41:2617–2621.
- Neu TR, Lawrence JR 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol*, 24: 11-25.
- Öztürk BY 2019. Intracellular and extracellular green synthesis of silver nanoparticles using *Desmodesmus* sp.: their Antibacterial and antifungal effects. *Caryologia. International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 72(1): 29-43.
- Ramkumar VS, Pugazhendhi A, Gopalakrishnan K, Sivagurunathan P, Saratale GD, Dung TNB, Kannapiran E 2017. Biofabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of seaweed *Enteromorpha compressa* and its biomedical properties. *Biotechnol Rep*, 14: 1-7.
- Roldan M, Thomas F, Castel S, Quesada A, Hernandez- Marine M 2004. Noninvasive pigment identification in single cells from living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3745-3750.
- Salem JK, El-Nahhal IM, Najri BA, Hammad TM, Kodeh F 2016. Effect of anionic surfactants on the surface plasmon resonance band of silver nanoparticles: determination of critical micelle concentration. *J. Mol. Liq.*, 223: 771-774.
- Sarafis V 1998. Chloroplasts: a structural approach. *J Plant Physiol*, 152:248–264.
- Shankar PD, Shobana S, Karuppusamy I, Pugazhendhi A, Ramkumar VS, Arvindnarayan S, Kumar G 2016. A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications. *Enzyme Microb. Technol.*, 95: 28-44.
- Song KC, Lee SM, Park TS, Lee BS 2009. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean J Chem Eng*, 26: 153-155.
- Sun C, Lee JSH, Zhang MQ 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev.*, 60: 1252-1265.
- Travan A, Pelillo C, Donati I, Marsich E, Benincasa M, Scarpa T, Semeraro S, Turco G, Gennaro R, Paoletti S 2009. Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity. *Biomacromolecules*, 10: 1429-1435.
- Venugopal K, Rather HA, Rajagopal K, Shanthi MP, Sheriff K, Illiyas M, RathEr RA, Manikandan E, Uvarajan S, Bhaskar M, Maaza M 2017. Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *J. Photochem. Photobiol.*, 167: 282-289.
- Williams, DH, Bardsley, B 1999. The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria. *Angew Chem Int Ed*, 38(9): 1172-1193.
- Yu Z, Pei H, Jiang L, Hou Q, Nie C, Zhang L 2018. Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two algae. *Biores Technol*, 247:904–914.



Eskişehir ilinde yayılış gösteren *Convolvulus L.* (Convolvulaceae) türleri üzerine taksonomik Araştırmalar

Derviş ÖZTÜRK^{1*} 

^{1*} Eskişehir Osmangazi University, Mahmudiye Horse Vocational School, Department of Plant and Animal Production, Eskişehir, Turkey

*Corresponding author : dozturk@ogu.edu.tr
Orcid No: <http://orcid.org/0000-0001-7189-7407>

Received : 29/08/2019
Accepted : 13/10/2019

Özet: 2017-2019 yılları arasında Eskişehir’de farklı lokalitelerinden toplanan *Convolvulus L.* (Convolvulaceae) türleri üzerine taksonomik çalışmaları kapsamaktadır. Eskişehir ilinin floristik açıdan ülke içerisindeki konumu irdelendiğinde İran- Turan fitocoğrafik bölgesinde yer almasına rağmen sahip olduğu değişik habitatlar birçok farklı fitocoğrafik elementlerini bünyesinde bulundurmasını sağlamıştır. Convolvulaceae (Sarmaşıkçiller) ailesinden ülkemizde 4 cins ve 40 türü doğal yayılış gösterir. Ayrıca süs bitkisi olarak yetiştirilir ve gıda olarak kullanılan türleride vardır. Türlerin teşhisinde başta, Flora of Turkey (Davis,1965-1988) adlı eser olmak üzere birçok kaynaktan faydalanılmıştır. *Convolvulus L.* taksonları için vejetasyon dönemi Nisan-Eylül arası olup, bir taksona ait çiçekli ve meyveli örnekler toplanmıştır. APG3 sistemine göre Eskişehir ilinde bulunan *Convolvulus L.* generusu yer alan 2’si endemik olan 7’si endemik olmayan 9 farklı taksonun genel görüntüsünün yanı sıra; çiçek yapısı (anter, filament, sepal ve petal, kaliks vb.), yaprak, meyve, tohum yapıları gibi morfolojik karakterlerin ölçümleri yapılarak CANON EOS marka fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilmiştir. Bitkilerin çiçeklenme, habitat ve yaşam formları, genel ve bölgesel yayılışları, IUCN kategorileri ve toplandığı lokaliteler hakkında da bilgiler verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Convolvulus L.*, Morfoloji, Habitat, Eskişehir

Taxonomic Investigations on Convolvulus L. (Convolvulaceae) Species Distributed in Eskişehir Province

Abstract: It covers taxonomic studies on *Convolvulus L.* (Convolvulaceae) species collected from different localities in Eskişehir between 2017-2019. When the floristic position of Eskişehir is examined in the country, although it is located in the Iranian-Turanian phytogeographical region, its different habitats have enabled it to contain many different phytogeographical elements. Convolvulaceae (Sarmaşıkçiller) family in our country of 4 genus and 40 species shows natural distribution. In addition to grown as ornamental plants and there are species used as food. Species identification, Flora of Turkey (Davis, 1965-1988) has been used in many sources, including the work. The vegetation period for *Convolvulus L.* taxa was between April and September and flowering and fruiting specimens of a taxon were collected. According to the APG3 system, in addition to the general view of 9 different taxa, 2 of which are endemic and 7 of which are not endemic; flower structure (anther, filament, sepal and petal, calyx, etc.), leaf, fruit, seed structures were measured and morphological characters were measured and photographed with CANON EOS camera. Information on flowering, habitat and life forms of plants, general and regional distributions, IUCN categories and localities are also given.

Keywords: *Convolvulus L.*, Morphology, Habitat, Eskişehir

© EJBACS. All rights reserved.

1. Giriş

Eskişehir ili İç Anadolu Bölgesinin Kuzeybatısında, 29° 58’ ve 32° 04’ Doğu boylamları ile 39° 06’ ve 40° 09’ Kuzey enlemleri arasında yer almaktadır. Yüzölçümü 13.901 km² dir. Türkiye içinde kapladığı alan oranı % 1,7’dir. Doğuda Ankara, Güneyde Konya ve Afyon, Batıda Kütahya ve Bilecik, Kuzeyde Bilecik, Bolu ve Ankara illeri ile çevrilidir. İl merkezinin denizden yüksekliği 801 m’dir. Türkiye’nin floristik çeşitliliğinin önemli nedenlerinden birkaçı edafik, jeolojik, jeomorfolojik çeşitlilik ve farklı topoğrafik yapılarıdır. Türkiye florası 154 familyaya ait 1.220 cins ve 11.707 tür ve tür altı

takson ile temsil edilmektedir. Türkiye sahip olduğu 11707 tür ve tür altı takson ile dünyada en zengin floraya sahip ülkelerden biridir. İç Anadolu’da stepin floristik bilançosu Türkiye Florasından yapılan araştırmaya göre tür sayısı 2000’ den fazladır. İç Anadolu’nun floristik zenginliğinin yanında endemik türlerinin sayısının fazla olması önemlidir (Akman ve ark., 2014). İç Anadolu steplerinde özellikle Labiatae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Crucifera, Boraginaceae, Cistaceae, Leguminosae familyalarına ait türler çoğunluktadır (Akman ve ark., 2014). Eskişehir ilinin floristik açıdan ülke içerisindeki konumu irdelendiğinde İran- Turan fitocoğrafik bölgesinde yer almasına rağmen sahip olduğu

değişik habitatlar birçok farklı fitocoğrafik elementlerini bünyesinde bulundurmasını sağlamıştır (Candan ve Huseyin, 2014).

Convolvulus L. cinsinin modern anlamda tanımlanması ise ilk kez 18 yy. sonlarında rastlamaktadır. Bu dönemde cins üyesi taksonlar filiform stigmaları, küçük braktelerin koltuklarından çıkan aksiller çiçekleri ve bilokular ovaryumları ile diğer Convolvulaceae cinslerinden ayrılmışlardır. Fakat *Convolvulus* L. cinsi üzerinde gerçekleştirilen çalışmaların artması ve taksonominin ilerlemesi ile birlikte önceden *Convolvulus* L. cinsi içinde kabul edilen birçok tür farklı cinslere aktarılmıştır (Wood ve ark., 2015).

Bu çalışmanın amacı; Eskişehir’de yayılış gösteren *Convolvulus* L. cinsine ait taksonlar arasındaki farklılığın net biçimde ortaya konulması için morfolojik çalışmanın yanı sıra, il sınırları içerisindeki yayılış gösterdiği alanlar, yükselti, habitat ve yaşam formu, yükselti ve risk kategorisinin değerlendirilmesi de yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Araştırma alanından toplanan *Convolvulus* L. çiçeklenme ayları olan Mayıs ve Temmuz aylarında 2018-2019 'da Eskişehir’de toplandı. Örnekler toplanırken her bir bitki örneğinin kök, gövde, yaprak, ve çiçeğe sahip olmasına dikkat edildi. Toplanan örneklerin ölçümleri yapıldıktan sonra bir kısmı herbaryum kurallarına göre kurutulmuş herbaryum materyali haline getirildi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi herbaryumunda (OUEF) saklanmaktadır. *Convolvulus* L. tanımlanması için Türkiye Florası kullanılmıştır. Morfolojik incelemeler, arazi çalışması sırasında yapılan gözlemler, toplanan canlı örnekler, herbaryum örnekleri üzerinde yapıldı. Taze bitki örneklerinden bazıları morfolojik ölçümler için kullanılmış ve detaylı açıklamaları hazırlanmıştır. Türün koruma statüleri IUCN tehdit kategorilerine göre değerlendirildi (Ekim ve ark., 2000; IUCN, 2001). Canon D5300 fotoğraf makinası ile fotoğrafları çekildi.

3. Bulgular ve Tartışma

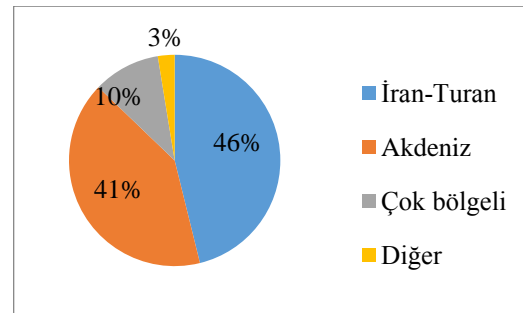
Bu çalışmada, Türkiye’de yayılış gösteren *Convolvulus* L. cinsi toplam 39 takson altında değerlendirilmiş ve bu taksonlardan 10 tanesi ülkemize özgü endemik olarak belirtilmiştir. Araştırma kapsamında yürütülen arazi çalışmaları sırasında bu cinse ait toplanan yaklaşık 150 herbaryum materyali üzerinde morfolojik incelemeler yapılmıştır. Convolvulaceae (Sarmaşıkgiller) ailesinden ülkemizde 4 cins ve 39 türü doğal yayılış gösterir (Menemen ve ark., 2002; Feinbrun-Dothan, 1978; Boissier, 1879; Weaver ve Riley, 1982). Süs bitkisi olarak yetiştirilir, gıda olarak kullanılan türleri vardır. Bir kısmı yatık veya sarılıcı, bir veya çok yıllık otsular veya çalılardır. Çiçekler yaprak koltuklarında tek veya kimoza veya uçta bulunur (Bentham ve Hooker, 1873). Brakteoller kaliksten küçük ve korolla genellikle tüylü, hafif lopludur. Eskişehir’deki *Convolvulus* L. türleri: *Convolvulus cantabrica*, *Convolvulus lineatus*, *Convolvulus phrygius*, *Convolvulus pulvinatus*, *Convolvulus compactus*,

Convolvulus arvensis, *Convolvulus galaticus*, *Convolvulus betonicifolius*, *Convolvulus holosericeus*’dur.

Tablo 1: *Convolvulus* L. taksonlarının Eskişehir’de toplanan lokaliteler.

Takson	Lokalite
1 <i>Convolvulus arvensis</i> L.	Günyüzü; Gecek-Atlas köyü arası, N 39°21'33.1"- E 31°43'50.2", 1230 m.
2 <i>Convolvulus lineatus</i> L.	Mihalıççık; Biçer-Üçbaşı köyü arası, N 39°44'16.7"- E 31°42'43.1", 862 m.
3 <i>Convolvulus galaticus</i> Rostan ex Choisy	Sivrihisar; Ballıhisar köyü çevresi, N 39°20'24.6"- E 31°34'52.6", 970 m.
4 <i>Convolvulus cantabrica</i> L.	Alpu; Bozan Ağaçlandırma sahası, N 39°47'45.94"- E 031°06'41.12", 842 m.
5 <i>Convolvulus betonicifolius</i> Miller	Eskişehir; Yörük Akçayır çevresi, N 39°43'37.08"- E 030°20'49.19", 882 m.
6 <i>Convolvulus holosericeus</i> Bieb.	Eskişehir, Orman Fidanlık yolu, N 39°43'37.11"- E 030°20'08", 870 m.
7 <i>Convolvulus compactus</i> BOISS.	Alpu; Bozan Ağaçlandırma sahası, N 39°47'45.94"- E 031°06'41.12", 840 m.
8 <i>Convolvulus pulvinatus</i> SAA'AD	Eskişehir, Orman Fidanlık yolu, N 39°43'36.01"- E 030°21'08", 860 m.
9 <i>Convolvulus phrygius</i> BORNM.	Eskişehir, Orman Fidanlık yolu, N 39°43'36.01"- E 030°21'08", 860 m.

Literatür taramalarına göre Türkiye’de yayılış gösteren *Convolvulus* L. cinsine mensup 39 takson Fitocoğrafik Bölgeleri açısından değerlendirilmiş ve bunlardan 18 tanesi (% 46) İran-Turan, 16 tanesi (% 41) Akdeniz, 4 (% 10) tanesi ise çok bölgeli olarak belirtilmiştir (Şekil 1).

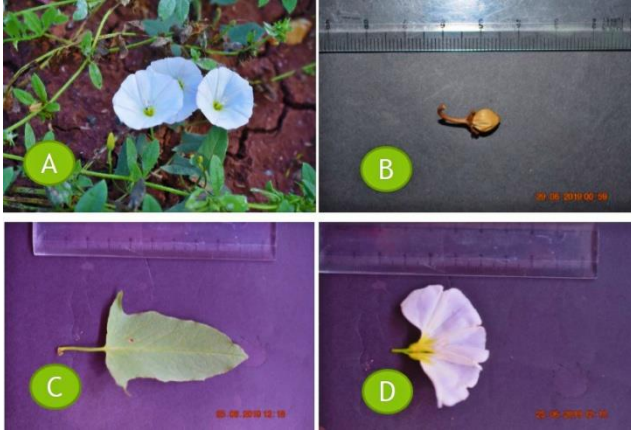


Şekil 1. *Convolvulus* L. cinsine mensup 39 takson Fitocoğrafik Bölgeleri

Convolvulus arvensis L., Sp. Pl. 1: 153 (1753).
Tip Örneği: [Avrupa] Hb. Linn. 218/1.

Sarıcı ya da tırmanıcı dallı çok yıllık otlardır. Toprak üstünde dallanmayan gövdeler 3 m ya da daha uzun olabilmektedir. Yapraklar tabanda kulakçıklı ya da otsu uzantılı, genellikle 3-5 cm, tüsüz ya da seyrek kısa tüslüdür. Çiçekler genellikle yaprak koltuklarında tek bulunur. Korolla beyaz ya da pembe, nadiren mavi renktedir. Çiçeklenme zamanı mayıs-eylül arası olup habitat ise kumlu stepler, tarla kenarları, yol kenarlarıdır.

200-1050 m. arası da yayılış göstermektedir. Yaşam formu hemikriptofittir. Ülkemizde oldukça geniş yayılım göstermektedir. Eskişehir bölgesinde 800 metre rakımlı birçok alanda rastlanılmıştır. Geniş yayılışlı ve düşük riskli (LC)'dir (Şekil 2).



Şekil 2. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

Convolvulus lineatus L., Systema ed. 10, 2: 923 (1759)
Lektotip Örneği: [Sicilya] Hifpaniae, Siciliae, Mediterranei maritimis. (Hb. Linn. 218/43).
=*C. lineatus* var. *angustifolius* Kotschy, Ins. Cyp. 285 (1865); =*C. intermedius* Loisel, in J. Bot. (Desvaux) 2: 264 (1809).

Genellikle sürünücü köklü, odunsu kaideli, yatık ya da dik durumlu bitkilerdir. Gövde boyları 3-30 cm arası, sık parlak gri tüylü çok yıllık bitkilerdir. Çiçekler yaprak koltuklarında ve uçlarda, tek ya da 2-7 çiçekli salkımlarda bulunur. Korolla pembe, bazen beyazdır. Çiçeklenme zamanı nisan-temmuz aylarıdır. Habitat ise kurak stepler, meşe altları, kayalık yamaçlar, nehir kenarları olup 800-2135m. yükseklikte yayılış göstermektedir. Yaşam formu ise hemikriptofittir. Genel ve bölgesel yayılış olarak Türkiye, K. Afrika, G. Avrupa, Kıbrıs, Kafkasya, Suriye'dir. Türkiye'de sık yayılım göstermektedir. Eskişehir bölgesinde ise Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Meşelik Yerleşkesi içerisindeki 810 m. rakımlı bölgelerde tespit edilmiştir. Geniş yayılışlı ve düşük riskli (LC) dir (Şekil 3).



Şekil 3. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

Convolvulus galaticus Rostan ex Choisy in DC., Prodr. 9: 408 (1845).

Lektotip Örneği: [Türkiye A/B4 Ankara] in Syria ad Ancyre (1794), Rostan (G- DC).

=*C. agrophilos* C. Koch in Linnaea 22: 745 (1849).

Toprakaltı sürünücü gövdeli ve yoğun parlak havlı tüylü, yatık otsu çok yıllıklardır. Yapraklar genişçe yumurtamsı, tabanda kalpsi olup dalgalı ve keskin dişli ile testeremsi kenarlıdır. Çiçekler yaprak koltuklarında, tek ya da 2-4 çiçekli salkımlarda halinde bulunur. Korolla pembe ya da açık mor renktedir. Çiçeklenme zamanı mayıs-ağustos olup habitatu çam ormanları, açık stepler, yaşlık yamaçlar, kültür alanları ve tarla kenarlarıdır. 880-2000 m. yükseklikte yayılış göstermektedir. Yaşam formu hemikriptofittir. Genel ve bölgesel yayılış Türkiye olup endemik bir türdür. Ülkemizde oldukça geniş yayılım gösteren bu türe Eskişehir bölgesinde Eskişehir - Seyitgazi karayolunun 800 metre rakımlı steplerinde rastlanılmıştır. Geniş yayılışlı ve düşük riskli (LC) dir (Şekil 4).



Şekil 4. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

Convolvulus cantabrica L., Sp. Pl. 1: 158 (1753).

Lektotip Örneği: [İtalya, Sicilya, Narbonne & Verona] Hb. Linn. 218/48

=*C. cardiosepalus* Boiss. Fl. Or. 4: 96 (1875); =*C. dorycnoides* De Not., Repert. Fl. Ligust.: 283 (1844); =*C. euxinus* Petrov in Bull. Soc. Nat. Mosc. 44: 142 (1935).

Odunsu kaideli çok yıllık otlar olup gövdeler yatık, dik ya da yükselici, uzun yumuşak tüylüdür. Boyları 10-45 cm arası olabilmektedir. Alt yapraklar dikdörtgensiz- spatülsü, saplar 2 cm ya da daha uzundur. Çiçekler terminal ve koltuk altlarında 1-4 çiçeklidir. Korolla pembe olup nadiren beyaz olabilmektedir. Çiçeklenme zamanı nisan-ağustos ayları arası ve habitat ise makilikler, killi topraklar, yol kenarları, kayalık yamaçlardır. 100-1700 m. arası yükseklikte yayılış göstermektedir. Yaşam formu hemikriptofittir. Genel ve bölgesel yayılış Türkiye, Akdeniz alanı, Balkanlar, Kafkasya İran ve Avrupa Birliği'dir. Türkiye'de Akdeniz ve Karadenize kıyısı olan bölgelerde tanımlanmasına rağmen, Eskişehir ve Ankara illerinde de tespit edilmiştir. Eskişehir bölgesinde Gökçekaya yolunda bulunan 410 metre rakımlı yamaçlarda tespit edilmiştir. Geniş yayılışlı ve düşük riskli (LC)'dir (Şekil 5).

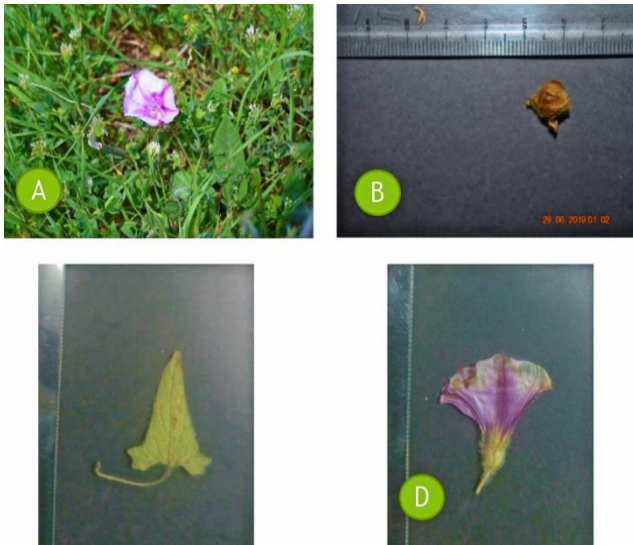


Şekil 5. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

Convolvulus betonicifolius Miller, Gard. Dict. ed. 8. no. 20 (1768).

Tip Örneği: [Afrika]

Tırmanıcı ya da sarılıcı, kısa tüylü otsu çok yıllıklardır. Gövde yaprakları saplı ya da tabanda oksu uzantılı olup loblar bazen dişli, yumurtamsı ile darca yumurtamsı olmaktadır. Çiçekler yaprak koltuklarında, her sap 1 veya 3 çiçeklidir. Korolla pembe ya da beyaz renktedir. Çiçeklenme zamanı Mayıs-temmuz ayları arasındadır. Habitat olarak boş ya da ekili tarlalar, yol kenarlarıdır. 300-1700m. yükselikte yayılış göstermektedir. Yaşam formu hemikriptofittir. Genel ve bölgesel yayılış olarak Türkiye, Balkanlar, Kıbrıs, Kırım, Kafkasya, Suriye, K. Irak, İran'dır. Türkiye'de sıklıkla görülen bu tür Eskişehir bölgesinde Türkmen Dağları ve Yenisoğça Yukarı Kalabak bölgesinin 1130 metre rakımlı alanlarında rastlanılmıştır. Geniş yayılışlı ve düşük riskli (LC)'dir (Şekil 6).



Şekil 6. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

Convolvulus holosericeus Bieb., Fl. Taur.-Cauc. 1: 147 (1808).

Tip Örneği: [Crimea] habitat in Tauriae maontibus calcereis, Marschall von Bieberstein (LE).

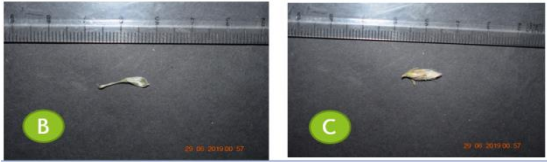
Odunsu tabanlı, yükselici ya da yatık formu, yatık parlak gri tüylü çok yıllıklardır. Alt yapraklar darca ters yumurtamsı ile şeritsi-ters mızrakı şeklindedir. Çiçekler bazen tek ve terminalde ya da yaprak eksenleri ya da terminal salkımlarda bulunur. Korolla beyaz ile soluk sarı renktedir. Çiçeklenme zamanı nisan-temmuz ayları olup habitatı kurak stepler, kayalık, kumlu, aşınmış ve kalkerli tepeler, kireçtaşı tarlalarıdır. 250-1700 m. arası yükseklikte yayılış göstermektedir. Yaşam formu hemikriptofittir. Genel ve bölgesel yayılış olarak Türkiye, Balkanlar, Kırım, Kafkasya'dır. Eskişehir'de Muttalıp bölgesinin 820 rakımlı alanlarında rastlanılmıştır. Geniş yayılışlı ve düşük riskli (LC)'dir (Şekil 7).



Şekil 7. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

Convolvulus pulvinatus Sa'ad, Convolvulus 148 (1967).

Bodur çalimsılar yapı olup yoğun, karayosunu benzeri yastıksı formu, köklerden odunsu dallı bitkilerdir. Gövdeler 8 cm'ye kadar boylanabilir. Yapraklar darca şeritsi ya da şeritsi-spatülsü şekilde olup, kıvrımlı, yatık ve parlak gri tüylüdür. Çiçekler terminalde bulunup, genellikle tektir. Korolla beyaz renkte, nadiren gül ya da sarı renkte olabilmektedir. Çiçeklenme zamanı Mayıs-ağustos ayları olup habitat olarak açık karaçam ormanı, stepler, çalılıklar, kalkerli ve serpantin yamaçlar, tarla kenarlarıdır. 200- 1700 m. arasındaki yükseklikte yayılış göstermektedir. Yaşam formu kamefittir. Genel ve bölgesel yayılış olarak Türkiye ve Balkanlardır. Türkiye'de sadece Eskişehir bölgesinde gözlenen bu tür Eskişehir-Arayıt Dağı'nın 1780 m rakımlı bölgelerinde tespit edilmiştir. Geniş yayılışlı ve düşük riskli (LC)'dir (Şekil 8).



Şekil 8. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Yaprak, C. Çiçek

Convolvulus compactus Boiss. Diagn. ser. 1 (4): 40 (1844).

Lektotip Örneği: [Türkiye] in Caria interiori, 1843, Pinard (G.).

=*C. cochlearis* Griseb., Spic 2: 76 (1844). =*C. parnassicus* Boiss. & Orph. in Boiss. Diagn. ser. 2 (3): 125 (1856). =*C. compactus* subsp. *parnassicus* (Boiss. & Orph.) Sa'ad, Convolvulus 141 (1967). =*C. konyacus* Sa'ad, Convolvulus 142 (1967). =*C. boissieri* Steudel subsp. *compactus* (Boiss.) Stace op. cit. 64: 58 (1971). =*C. boissieri* subsp. *parnassicus* (Boiss. & Orph.) Kuzmanov in Jordanov, Fl. Nar. Rep. Bälğ. 8: 451 (1982).

Bodur çalimsı bitkilerdir. Karayosunu benzeri yastıksı formu ve köklerden odunsu dallıdır. Gövdeler 8 cm'ye kadar boylanabilirler. Yapraklar darca şeritsi ya da şeritsi-spatülsü formda olup, kıvrımlı, yatık ve parlak gri tüylüdür. Çiçekler terminalde ve genellikle tektir. Korolla beyaz renkte, nadiren gül ya da sarı renkte olabilir. Çiçeklenme zamanı Mayıs- Ağustos ayları arası olup habitatu ve açık karaçam ormanı, stepler, çalılıklar, kalkerli ve serpantin yamaçlar, tarla kenarlarıdır. 200-1135 m. arası yükseklikte yayılış göstermektedir. Yaşam formu kamefittir. Genel ve bölgesel yayılış olarak Türkiye ve Balkanlardır. Türkiye'de geniş yayılım göstermektedir. Eskişehir'de Günyüzü-Kayakent bölgesindeki 1290 m rakımlı steplerde rastlanılmıştır. Geniş yayılışlı ve düşük riskli (LC)'dir (Şekil 9).



Şekil 9. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

Convolvulus phrygius Bornm. in Feddes Rep. 5: 168 (1908).

Tip Örneği: [Türkiye B3 Eskişehir] Eski-Scheher ad viam versus Tschifteler (Çifteler), 13.v.1901, Warbung & Endlich (holo B.).

=*C. pulvinatus* Sa'ad, Convolvulus 148 (1967).

Bodur yarı yatık ya da yastıksı formu küçük çalimsıdır. Yapraklar sık parlak gri tüylü, sapsız, spatülsü ile ters mızraksı olup, 3-18 mm boylanmaya sahiptir. Çiçekler terminal ya da yaprak koltuklarında, tek yada dallı salkımlarda 2-7 adet bulunmaktadır. Korolla beyaz renkte olup, dışta 5 pembe bantlıdır. Çiçeklenme zamanı Mayıs-haziran arası olup habitatu stepler ve açık *Pinus nigra* L. ormanlarıdır. 850-1200 m. arası yükseklikte yayılış göstermektedir. Yaşam formu kamefittir. Genel ve bölgesel yayılış olarak Türkiye bulunan endemik bir türdür. Türkiye'de sadece Eskişehir ve Denizli bölgelerinde tespit edilmiştir. Eskişehir bölgesinde Seyitgazi yolu üzerindeki 900 m rakımlı yamaçlarda tespit edilmiştir. Dar yayılışlı ve duyarlı (NT)'dir (Şekil 10).



Şekil 10. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

4. Sonuç

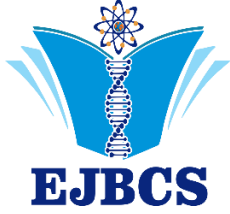
APG3 sistemine göre Eskişehir Bölgesinde bulunan *Convolvulus* L. genusa ait 9 takson taksonomik olarak incelenmiştir. Çalışma kapsamında değerlendirilen taksonlar içerisinde *C. phrygius*, *C. galaticus* endemik olup, bu cinsin Türkiye'deki endemizm oranı % 25.6'dır. Türkiye Florası'nda ülkemize özgü olarak belirtilen, İran ve Lübnan'da yayılış gösterdiğine ait verilere, bu ülkelerin flora kayıtlarından ulaşılmıştır (Johnson, 2015; Reching, 1979; Mouterde, 1986). Çalışmamızda daha önce Eskişehir çevresinde yapılan çalışmalarda elde edilen bilgiler ışığında her bir türün yaprak şekli, çiçek anatomisi, tohum morfolojisi, çiçeklenme zamanı, habitat ve yaşam formu, genel ve bölgesel yayılış alanları ve IUCN kategorisi hakkında bilgiler verilmiştir. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na göre (Ekim ve ark., 2001), tehlike kategorisi VU olarak belirtilen *C. phrygius* ise, Aykurt ve Sümbül (2014) çalışmasına göre türün yayılış gösterdiği alan ve olgun birey sayısı göz önüne alınarak çalışma kapsamında NT kategorisinde değerlendirilmiş olup çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Aykurt ve Sümbül (2014)'ün çalışmasına göre *C. lineatus*, *C. cantabrica*, *C. holosericeus*, *C.*

compactus, *C. galaticus*, *C. betonicifolius*, *C. arvensis* taksonlarının tehlike kategorileri ise LC olarak belirtilmiştir. Çalışma kapsamında Türkiye’de yayılış gösteren *Convolvulus* cinsine ait taksonların Fitocoğrafik Bölgeleri açısından değerlendirilmiş ve bunlardan 18 tanesi (% 46) İran-Turan, 16 tanesi (% 41) Akdeniz, 1 tanesi (% 3) Saharo-Sindian Fitocoğrafik Bölgesinin elementi ve 4 (% 10) tanesi ise çok bölgeli olarak belirtilmiştir (Şekil 1). Morfolojik çalışmalar sonucunda ise, her tür için tanımlamalar yapılmış ve Türkiye Florası’ndaki betimler karşılaştırılmıştır. Özellikle türleri birbirinden ayırmada kullanılan en önemli karakterlerden olan habit, sepaller, pistil, stamen ve kapsül betimlemeleri desteklenmiştir. Çalışma sonucunda, Türkiye Florası’nda iki farklı tür olarak değerlendirilen *C. phrygius* ve *C. pulvinatus* ise Aykurt ve Sümbül (2014) çalışmasına göre yayılış alanları, morfolojik, palinolojik ve moleküler bulgularına göre birleştirilerek daha önce yayınlanan *C. phrygius* adının önceliği ve geçerliliği çalışmamız ile de desteklenmiştir. Bu çalışma yapılacak olan flora çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akman Y, Ketenoğlu O, Kurt L, Vural M 2014. İç Anadolu Step Vejetasyonu. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Aykurt C, Sümbül H 2014. Taxonomic revision of the genus *Convolvulus* L. (Convolvulaceae) in Turkey. *Biodicon* 7(2): 1-28.
- Bentham, G, & Hooker, J D (1873). 1876. *Genera plantarum*, 2(1-8), 1-279.
- Boissier, E. 1879. *Flora Orientalis*. Vol. 4, Geneve Botany Press: 84-111.
- Candan A, Huseyin S 2014. Taxonomic revision of the genus *Convolvulus* L. (Convolvulaceae) in Turkey. *Biodicon* 7/2:1-28.
- Davis PH 1965-1985. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 1-9 Edinburg: Edinburg University Press.
- Davis PH, Mill RR, Tan K 1988: *Convolvulus* L. In: Davis PH, Mill RR, Tan K (Editors), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Suppl. I), Edinburgh: Edinburgh Univ. Press, 10: 182.
- Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N 2001. *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Demeği*. Ankara: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları
- Feinbrun-Dothan N 1978. *Flora Palaestina*, Jerusalem: The Israel Academy of Sciences and Humanities Press, pp 33-43.
- IUCN 2001. *IUCN Red List Categories: Version 3.1*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Johnson 2015. A taxonomic revision of *Convolvulus* L. (Convolvulaceae) in Australia *Austrobaileya* 6(1): 1-39.
- Menemen Y, Jury SL 2002. Pollen Studies on Some Species of the Genus *Convolvulus* L. (Convolvulaceae) from Morocco. *Turk J. Bot* 26: 141-148.
- Mouterde P 1986. *Convolvulus* L. *Nouvelle Flore Du Liban et de la Syrie*, Dar El-Machreq Éditeurs, Beyrouth: Liban, pp 334-344.

- Rechinger KH 1979. *Convolvulus* L. – in: Rechinger, K. H. (ed.), *Flora des Iranischen Hochlandes und der Umrahbenden Gebirge*, Austria: Graz.
- Weaver SE, Riley WR 1982. *The Biology Of Canadian Weeds*: 53. *Convolvulus arvensis* L. *Can J Plant Sci* 62(2): 461-472.
- Wood JR, Williams BR, Mitchell TC, Carine MA, Harris DJ, & Scotland RW 2015. A foundation monograph of *Convolvulus* L. (Convolvulaceae) *PhytoKeys* (51):1.



The leaf traits of a Mediterranean species (*Arbutus unedo* L.) in an undisturbed and planted forests in Euxine Region

Hakan Yılmaz^{1*}, Hamdi Güray Kutbay², Burak Sürmen³

¹Ordu University, Akkus Vocational School, Department of Forestry, Ordu, TURKEY

²Ondokuz Mayıs University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology, Samsun, Türkiye

³Karamanoğlu Mehmetbey University, Kamil Özdağ Science Faculty, Department of Biology, Karaman, Türkiye

*Corresponding author : hakanyilmaz@odu.edu.tr

Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-0113-8277>

Received : 20/09/2019

Accepted : 13/10/2019

Abstract: We compared leaf traits of *Arbutus unedo* in different forest habitats in this research. The leaf traits are specific leaf area and specific leaf mass. These traits are very important leaf features in ecosystem dynamics. SLA and LMA response to environment and effect on plant functions (i.e. leaf nutrients and economy, gas exchanges with atmosphere and etc.). *Arbutus unedo* is a mediterranean enclave species, naturally growing in Euro-Siberian floristic region. Leaf traits of *A. unedo* were investigated on a natural and *Pinus pinaster* planted forest. We collected leaves during vegetation period from forests and calculated SLA and LMA values. We found that mean SLA values in natural forest are higher than that the *P. pinaster* planted forest and LMA values in *P. pinaster* planted forest are high than the natural forest. But statistical differences were not found between forest habitats.

Keywords: Specific leaf area and mass, habitat types, ecosystem dynamic, canopy density

Öksin bölgesinde plantasyon yapılan ve tahribata uğramamış ormanlarda bir Akdeniz türünün (*Arbutus unedo*) yaprak karakterleri

Özet: Bu araştırmada, farklı orman habitatlarındaki *Arbutus unedo*'nun yaprak karakterlerini karşılaştırdık. Spesifik yaprak alanı ve spesifik yaprak ağırlığı yaprak karakterleridir. Bu karakterler ekosistem dinamiği için çok önemli yaprak özellikleridir. SLA ve LMA çevreye karşı tepki verir ve bitki fonksiyonlarını (örneğin; yaprak besinleri ve ekonomisi, atmosfer ile gaz alışverişi vb.) etkiler. *A. unedo*, doğal olarak Avrupa-Sibirya floristik bölgesinde yetişen bir Akdeniz enklav türüdür. *A. unedo*'nun yaprak özellikleri doğal ve *P. pinaster* ekili ormanlarda incelenmiştir. Vejetasyon dönemi boyunca ormanlardan yaprak örnekleri toplandı ve SLA ve LMA değerleri hesaplandı. Doğal ormandaki ortalama SLA değerlerinin *P. pinaster* ekili ormandan yüksek olduğu, *P. pinaster* ekili ormanda, LMA değerlerinin doğal ormandan yüksek olduğu bulunmuştur. Fakat orman habitatları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Spesifik yaprak alanı ve ağırlığı, habitat tipleri, ekosistem dinamiği, kanopi yoğunluğu

1. Giriş

Spesifik yaprak alanı (SLA) ve spesifik yaprak ağırlığı (LMA) ekosistem dinamiklerinin belirlenmesinde kullanılan önemli yaprak karakterleridir (Sürmen ve ark., 2016). Bitkilerin çevrelere verdikleri cevaplar, SLA ve LMA değerlerinin bitkiler arasında farklılıklar göstermesine neden olmaktadır. Bundan dolayı bitki ekolojisi çalışmalarının çoğunda bu iki yaprak karakteri incelenmektedir (Wang, 2007). SLA, net asimilasyon oranı ve bitkilerin nispi büyüme oranı ile ilişkili iken, LMA ise çevresel stres faktörleri ile ilişkilidir (Reich ve ark., 1992; Cornelissen ve ark., 2003). Örneğin, yüksek LMA değerlerine sahip bitkilerin kuraklık stresine karşı

primer adaptasyonlar geliştirdikleri yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Wright ve ark., 2004). Küresel ölçekte yapılan çalışmalara baktığımızda; SLA ve LMA karakterlerinin bitkilerin verdikleri farklı tepkiler ile ilişkili olduğunu ortaya koyan çalışmaların devam ettiği görülmektedir (Wright ve ark., 2005; Lavorel ve ark., 2006).

Farklı ekosistemlerde yer alan bitkilerin yaprak karakterleri ile olan ilişkilerinin belirlenmesi, bitkilerin verecekleri farklı tepkilerin açıklanması bakımından önemlidir. Bazı çalışmalarda komünite ve dominant tür düzeyinde yaprak karakterleri ile ekosistem özellikleri arasındaki ilişkiler açıklanmıştır (Garnier ve ark., 2004).

Özellikle bitki türlerinin topraktaki besin içeriklerine verdikleri tepkiler, yaprak karakterleri (SLA ve LMA) üzerinden tespit edilmektedir (Wang, 2007). Bu nedenle SLA ve LMA, bu tür çalışmalarda indikatör yaprak karakterleri olarak kullanılmaktadır.

Örneğin; SLA ışık ve neme karşı bitkilerin kazandıkları stratejilerin belirlenmesinde, bununla beraber toprağın su tutma kapasitesi, vejetasyonun tepe tacı kapalılığı ve ışık yoğunluğu gibi faktörler ile de yakından ilişkilidir (Milla ve ark., 2008; Sellin, 2001). LMA ise aynı türün farklı bireylerinde mevsimsel ve çevresel koşullara göre değişmektedir. Bu nedenle birçok bitki ekolojisi ve fizyolojisi çalışmalarında bu iki yaprak parametresi yaygın olarak kullanılmaktadır (Jullien ve ark., 2009; Kraft ve ark., 2008).

A. unedo coğrafik olarak geniş bir yayılma alanına sahip olan Akdeniz ikliminin görüldüğü bölgelerde bulunmaktadır. Tür, Türkiye’de Çanakkale, Balıkesir, İstanbul, Kocaeli, Bursa, Sakarya, Zonguldak, Bolu, Sinop, Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Kahramanmaraş, Hatay Mersin, Antalya, Muğla ve İzmir gibi illerde yayılışa sahiptir (Davis, 1978; Karadeniz ve ark., 1996; Varol, 2003).

Bu çalışmada, Öksin foristik bölgesinde doğal yayılışa sahip Akdeniz enklavı olan *A. unedo* L. türünün farklı habitatlar dikkate alınarak yaprak karakterleri (SLA ve LMA) incelenmiştir.

2. Materyal ve Metod

Bu çalışma, Orta Karadeniz bölgesinde Ordu İli Ünye ilçesinde yer alan Asarkaya ormanında yapılmıştır. Araştırma alanı, okyanus iklimin tam denizel iklim tipine sahip olup, Sonbahar-Kış-Yaz-İlkbahar yağış rejimi görülmektedir. Araştırma alanının yıllık ortalama yağış miktarı 1162 mm, yaz dönemi yağmur miktarı 263.5 mm’dir. Alanın yıllık ortalama sıcaklığı 14.5° C, en sıcak ayın maksimum sıcaklık ortalaması 26.9° C ve en soğuk ayın minimum sıcaklık ortalaması 4.3° C’dir (Korkmaz ve ark., 2008).

Çalışmanın amacına uygun olarak iki farklı lokalite seçilmiştir. Birinci lokalite doğal bir orman olup deniz seviyesinden yüksekliği 205 m’dir. Alanın dominant ağaç türü öksin fitocoğrafik bölgesine ait *Fagus orientalis* Lipsky’dir (Korkmaz ve ark., 2008). Diğer ağaç ve çalı türleri ise *Populus tremula* L. (Salicaceae), *Sorbus torminalis* L. (Rosaceae), *Quercus hartwissiana* Steven. (Fagaceae), *Vaccinium arctostaphylos* L. (Ericaceae), *Ilex aquifolium* L. (Aquifoliaceae), *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) ve *Rhododendron ponticum* L. (Ericaceae), otsu türler arasında ise *Rubus discolor* Weithe ve Nees, *Veronica magna* M. A. Fischer, *Cirsium pseudopersonata* Boiss. ve Bal subsp. *pseudopersonata* ve *Carex pendula* Huds yer almaktadır. Eğim yaklaşık % 30-35’dir. Anakaya kumtaşı olup toprak tekstürü kumlu-killi-tınlıdır (Yılmaz ve ark., 2013).

İkinci lokalite, yangın tahribatından sonra müdahale edilmiş bir orman olup deniz seviyesinden yüksekliği 250 m’dir. Bu alan genel olarak birinci lokalitedeki aynı türleri

içermekle beraber alana *P. pinaster* Ait. plantasyonu uygulaması yapılmıştır. Orman altı tabaka ise *Smilax excelsa* L., *Cirsium pseudopersonata* Boiss. & Bal subsp. *pseudopersonata*, *Carex pendula* Huds. ve *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn türleri ile temsil edilmektedir (Yılmaz ve ark., 2013). Eğim yaklaşık % 30-35’dir. Anakaya kumtaşı olup toprak tekstürü kumlu-killi-tınlıdır.

Çalışma *Arbutus unedo* L. türünün bir vejetasyon süreci boyunca planlanmış olup Haziran 2011 – Mayıs 2012 tarihlerini kapsamaktadır. Doğal ve plantasyon yapılan orman olmak üzere belirlenen iki araştırma alanından üçer adet olmak üzere 6 devamlı örnek parsel belirlenmiştir. Örnek parsellerin seçiminde yükseklik, yön, vejetasyonun örtü durumu ve parsellerde en az 10 tane bireyin bulunmasına dikkat edilmiştir. Daimi örnek parsellerde *Arbutus unedo* L. türüne ait 5 farklı bitki birey seçilmiştir. Alan içi varyasyonları önlemek için her birey çifti arasında en az 2,5 m mesafe olmasına dikkat edilmiştir (Boerner ve Koslowsky, 1989). Böylece her iki araştırma alanında 15 birey olmak üzere toplam 30 bitki bireyi belirlenmiştir.

Yaprak örneklerinin alınacağı dallar önceden belirlenerek vejetasyon dönemi boyunca aynı dala ait ve fizyolojik yönden benzer yapraklar toplanmıştır (Kutbay ve ark., 2003; van Heerwaarden ve ark., 2003; Wright ve Westoby, 2003; Yılmaz ve ark., 2013).

Her iki lokaliteden toplanan *A. unedo* türüne ait yaprakların sapları kesilip birkaç gün pres altında bekletilmiştir. Daha sonra düzgünleşen yaprakların alanları Leaf Area Measurement 1.3 (Anonim, 2003) tarayıcı programı ile ölçülmüştür.

Alanları ölçülen yaprak örnekleri, etüvde 70° C ’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulup kuru ağırlıkları tartılmıştır.

Spesifik yaprak alanı (SLA), birim alana düşen yaprak ağırlığı (LMA) aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplanmıştır.

$$SLA = \frac{\text{Toplam Yaprak Alanı (dm}^2\text{)}}{\text{Toplam Kuru Yaprak Ağırlığı (g)}}$$

$$LMA = \frac{\text{Toplam Kuru Yaprak Ağırlığı (g)}}{\text{Toplam Yaprak Alanı (dm}^2\text{)}}$$

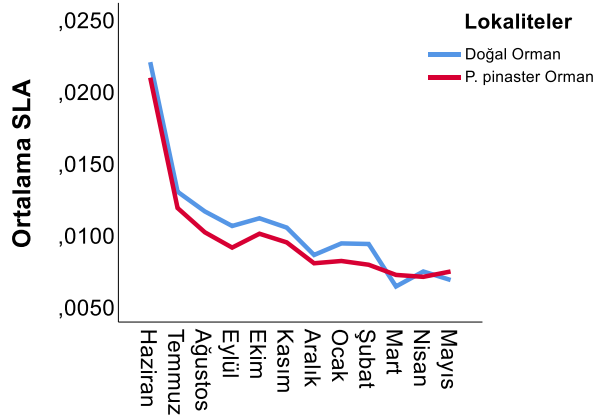
Çalışmada tüm verilerin istatistiksel analizleri SPSS Version 25 paket programı kullanılarak yapılmıştır (Anonim, 2017). Spesifik yaprak alanı (SLA), birim alan başına düşen yaprak ağırlığı (LMA) değerlerinin aylara ve lokalitelere göre değişiminin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır.

3. Bulgular

Doğal orman ve sahil çamı plantasyonu yapılmış ormanda (*P. pinaster*) yayılış gösteren *A. unedo* türüne ait ortalama spesifik yaprak alanı (SLA) ve birim alan başına düşen yaprak ağırlığı (LMA) verileri, SLA ve LMA bakımından

türün vejetasyon dönemi boyunca aylar arası farklılıkları ve lokaliteler arası farklılıklar Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile verilmiştir.

Vejetatif gelişimin Mayıs içerisinde başladığı belirlenen *A. unedo* ait SLA değerleri incelendiğinde, her iki lokalite için en yüksek değerler haziran ayında hesaplanmıştır. Vejetasyon sürecinin sonuna doğru nispeten azalarak devam etmiştir. Genel olarak doğal ormanda türe ait SLA değerleri yüksek bulunmuştur (Şekil 1).



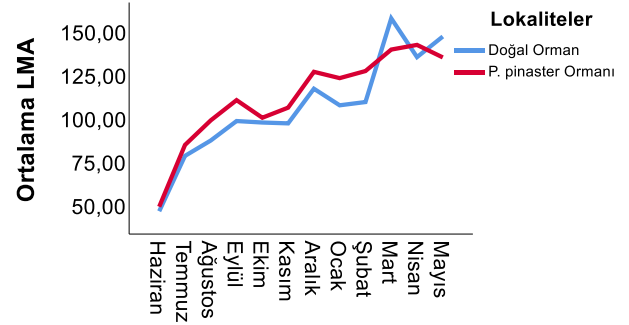
Şekil 1. Doğal ve *P. pinaster* ormanlarında *A. unedo*'ya ait aylık ortalama SLA değerleri

Türün her aya ait SLA değerlerinin lokaliteler arası farklılığı incelendiğinde, Mart ayı hariç diğer aylarda önemli farklılıklar bulunmamıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Her bir ayda *A. unedo*'ya ait SLA değerlerinin Doğal ve *P. pinaster* ormanları arasındaki farklılığın tek yönlü ANOVA sonuçları

Aylar	SLA		P
	Doğal orman	<i>P. pinaster</i> ormanı	
Haziran	0.022±0.002	0.021±0.002	0.758 ÖD
Temmuz	0.013±0.001	0.012±0.000	0.376 ÖD
Ağustos	0.012±0.001	0.010±0.000	0.180 ÖD
Eylül	0.011±0.002	0.009±0.000	0.404 ÖD
Ekim	0.011±0.002	0.010±0.001	0.653 ÖD
Kasım	0.011±0.001	0.009±0.000	0.350 ÖD
Aralık	0.009±0.000	0.008±0.001	0.416 ÖD
Ocak	0.009±0.001	0.008±0.000	0.103 ÖD
Şubat	0.009±0.001	0.008±0.000	0.220 ÖD
Mart	0.006±0.000	0.007±0.000	0.048*
Nisan	0.007±0.000	0.007±0.000	0.248 ÖD
Mayıs	0.007±0.000	0.008±0.000	0.095 ÖD

Türe ait LMA değerleri incelendiğinde doğal ormanda türe ait en yüksek değer martta, en düşük değer haziranda; *P. pinaster* ormanında ise en yüksek değer Nisan'da olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Doğal ve *P. pinaster* ormanlarında *A. unedo*'ya ait aylık ortalama LMA değerleri

Her aya ait LMA değerlerinin lokaliteler arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde önemli farklılıklar bulunmamıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Her bir ayda *A. unedo*'ya ait LMA değerlerinin Doğal ve *P. pinaster* ormanları arasındaki farklılığın tek yönlü ANOVA sonuçları

Aylar	LMA		P
	Doğal Orman	<i>P. pinaster</i> Ormanı	
Haziran	46.48±5.05	49.07±5.23	0.740 ÖD
Temmuz	78.36±7.22	84.64±2.24	0.453 ÖD
Ağustos	87.21±6.42	98.82±3.00	0.177 ÖD
Eylül	98.42±12.92	110.45±3.48	0.419 ÖD
Ekim	97.57±20.06	100.32±5.91	0.901 ÖD
Kasım	97.07±8.35	106.12±2.53	0.358 ÖD
Aralık	117.02±3.33	126.76±9.98	0.407 ÖD
Ocak	107.48±6.26	123.13±4.22	0.107 ÖD
Şubat	109.36±10.22	127.21±4.07	0.180 ÖD
Mart	157.57±6.19	139.58±2.99	0.059 ÖD
Nisan	135.23±4.21	142.26±3.17	0.253 ÖD
Mayıs	147.09±5.15	135.05±2.35	0.101 ÖD

Lokalite içinde SLA ve LMA değerlerinin aylar arasındaki ilişkisi istatistiksel olarak incelendiğinde, her bir lokalite için SLA ve LMA değerlerinin aylar arasındaki farklılığı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 3. Doğal ve *P. pinaster* ormanlarında *A. unedo*'ya ait SLA değerlerinin aylar arasındaki tek yönlü ANOVA sonuçları

Lokalite	Değişken	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	P
Doğal Orman	LMA	30595	11	2781	11,1	**
	SLA	0	24	0		
	LMA	36565	35			
<i>P. pinaster</i>	SLA	0	11	0	23,6	**
	LMA	23508	11	2137	33,7	**
	SLA	1520	24	63		
		25028	35			

Son olarak, lokaliteler arasında türe ait SLA ve LMA değerleri incelendiğinde, istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmamıştır.

Tablo 4. Vejetasyon dönemi boyunca *A. unedo*'ya ait SLA ve LMA değerlerinin lokaliteler arasındaki farklılığının tek yönlü ANOVA sonuçları

	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F	P
SLA	Gruplar arası	0	0	0.673	ÖD
	Grup içi	0	0		
	Toplam	0	71		
LMA	Gruplar arası	521	521	0.592	ÖD
	Grup içi	61594	879		
	Toplam	62115	71		

3. Tartışma ve Sonuç

Akdeniz iklimine sahip ekosistemlerde bazı herdem yeşil türler yılın büyük bir kısmında (bazen tamamında) aktiftirler. Çalışma boyunca yaptığımız gözlemlerde *A. unedo*'nun doğal ormanda yıl boyunca meyvelendiği; bir vejetasyon dönemi boyunca aynı sürgünde hem eski hemde yeni meyvelerin bir arada bulunduğu görülmüştür. Bu gözlem, Milla ve ark. (2009) tarafından *A. unedo* ile ilgili yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

Herdem yeşil türlerin SLA değerleri mevsimsel olarak çok fazla değişmemektedir (Misson ve ark., 2006). Fakat yapılan son araştırmalarda kurak devrenin olduğu bazı ormanlarda mevsimler boyunca SLA değerlerinin önemli farklılıklar sergilediği bulunmuştur (Prior ve ark., 2004). Bu mevsimsel değişimlerin daha çok herdem ormanlarda meydana geldiği ve özellikle su ve ışık miktarının mevsimsel farklılıklarından kaynaklandığı belirtmiştir (Neuvellon ve ark., 2010).

Ayrıca yüksek düzeyde UV güneş radyasyonu maruz kalan bitkilerde fotooksidatif hasara ve bitki gelişiminde değişimlere neden olabilir (A-H-Mackerness, 2000; Frohnmeyer ve Staiger, 2003; Li ve ark., 2010). Bitkiler UV radyasyonunu tolere etmek için alan başına yaprak ağırlığında (LMA) artışlar gibi yaprak morfolojisinde bir takım değişiklikler meydana gelir (Bernal ve ark., 2013; Verdagner ve ark., 2012). Bu durum özellikle sklerofilik türlerde yaprak dokularının güçlenmesini sağlar (Bussotti ve ark., 2014).

Bu çalışmada, doğal ormanda *P. pinaster* ormanına göre türün SLA değerlerinde daha fazla değişkenlik bulunmuştur. Bu varyasyonun başlıca nedeni olarak çalışılan türün bulunduğu vejetasyon tabakasının üst katında *F. orientalis*, *Q. hartwissiana*, *P. tremula* ve *S. torminalis* gibi yaprak dökken türlerin Kasım-Nisan dönemini yapraksız geçirmesidir (Yılmaz ve ark., 2013). Çalışılan diğer ormanda ise böyle bir durum ortaya çıkmamaktadır.

Orman ekosistemlerinde spesifik yaprak ağırlığı (LMA) değişimi vejetasyonun üst katından aşağıya doğru azaldığı bulunmuştur (Jurik, 1986). Ayrıca gölge bitkilerinde (Sciophyt'ler) yaprakların güneş bitkilerine (Heliophyt'ler)

göre daha düşük LMA değerlerine sahip olduğu bulunmuştur (Walters ve ark., 1993). Yılmaz (2009) yaptığı çalışmada ise doğal orman vejetasyonunda ağaç katını oluşturan türler ile çalı katını oluşturan *Vaccinium arctostaphylos* türü arasında LMA bakımından fark olmadığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada *Arbutus unedo*'ya ait LMA değerlerinin, Yılmaz (2009) tarafından ağaç ve çalı katına ait LMA değerleri karşılaştırıldığında birbirine yakın değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir.

A. unedo'ya ait LMA değerleri hem doğal ormanda hem de *P. pinaster* ormanında, vejetatif dönemin başlangıcında düşük iken vejetatif büyümenin tamamlandığı Eylül, Ekim ve Kasım'da yükselmekte ve daha sonra yeniden düşmeye başlamaktadır. LMA'daki bu değişim Orgeas ve ark. (2002)'nin, bitkilerin herhangi bir fenolojik gelişiminden hemen önce yoğun aktiviteye hazırlık olarak spesifik yaprak ağırlığını artırması modeline uygunluk gösterir.

Akdeniz ekosistemlerinde bitkilerin hayatta kalması da büyük ölçüde yağış rejimine bağlıdır (Díaz-Guerra ve ark., 2019). Düşük su varlığının Akdeniz odunsu türleri üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Bussotti ve ark., 2014; Matesanz ve Valladares, 2014; Sardans ve Peñuelas, 2012). Genel olarak, su varlığında bir azalma ile yüksek UV ışığına maruz kalan yapraklarda daha yüksek LMA değerleri meydana gelmektedir (Bussotti ve ark., 2002; Sardans ve Peñuelas, 2013; Valladares ve Sánchez-Gómez, 2006). Su kıtlığı yaşayan bitkiler için, LMA'daki (yaygın olarak sklerofilik bir indeks olarak kullanılan) artış, terleme yoluyla su kaybını azaltmak için etkili bir mekanizmadır (Bussotti, 2008; Sardans ve Peñuelas, 2013).

Akdeniz Bölgesinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, türe ait SLA ve LMA değerleri farklılıklar sergilemektedir. Genel olarak bakıldığında ise SLA ve LMA değerlerinin kendi floristik bölgesinde daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir (Tablo 5).

Tablo 5. *A. unedo*'ya ait SLA ve LMA değerlerinin Akdeniz bölgesinde yapılan farklı çalışmalar ile karşılaştırılması

	SLA (dm ² /g)	LMA (g/dm ²)
Doğal orman	0.0114 ± 0.004	106 ± 32
<i>P. pinaster</i> ormanı	0.0098 ± 0.004	111 ± 26
Gratani ve Varone, (2004)	0.0678 ± 0.002	148 ± 10
Sperlich ve ark. (2015) Güneş yaprakları	-	131 ± 11
Sperlich ve ark. (2015) Gölge yaprakları	-	115 ± 13
Díaz-Guerra ve ark. (2019)		140 ± 3.4

Sperlich ve ark. (2015) güneş gören yaprakların gölgede kalan yapraklara göre daha yüksek LMA değerlerine sahip olduğunu bulmuşlardır. Dolayısıyla gölge yapraklarının daha yüksek SLA değerlerine sahip olduğu ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada, *Arbutus unedo* her iki orman tipinde tepe tacının altında yer almasına rağmen kanopi seviyelerinden

dolayı yaprak karakterleri arasında farklılıklar vardır. Araştırma alanlarına ait tepe tacı kapalılığı incelendiğinde doğal ormanın daha kapalı olduğu dolayısıyla ışık girişi daha azdır (Tablo 6).

Tablo 6. Orman ve Su İşleri Bakanlığı (2010) ve Yılmaz (2013) tarafından hesaplanan çalışma alanlarının toprak özelliklerine ait değerler

	Doğal Orman	<i>P. pinaster</i> Ormanı
Kanopi kapalılığı (%)	60.24 ± 3.97	49.77 ± 3.67
Toprak pH'sı	6.19 ± 0.18	6.28 ± 0.14
Kum İçeriği (%)	43.79 ± 2.14	43.90 ± 1.27
Kil içeriği (%)	24.97 ± 2.38	30.31 ± 1.64
Silt içeriği (%)	31.24 ± 0.73	25.79 ± 2.85
Organik madde (%)	3.49 ± 0.25	4.00 ± 0.60
Toprak total N (%)	0.19 ± 0.01	0.13 ± 0.02
Toprak C/N oranı	15.62 ± 2.54	12.32 ± 1.41
Toprak P (ppm)	4.40 ± 0.20	4.00 ± 0.10

Sonuç olarak yaprak karakterlerine ait değerlerin lokaliteler arasında istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunsun da, kapalılığın yüksek olduğu doğal ormanda spesifik yaprak alanının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Araştırma yapılan ormanların toprak özellikleri birbirine yakın olmasından dolayı bu farklılığın tepe tacı kapalılığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tablo 6).

Yazar katkıları:

H. Yılmaz araştırmanın tasarım ve uygulamasına, sonuçların analizine ve yazının yazılmasına, H. G. Kutbay araştırmanın tasarım, sonuçların analizine, B. Sürmen sonuçların analizine ve yazının katkıda bulunmuştur.

Çıkar çatışması bildirim:

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

References

A-H-Mackerness S 2000. Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280–320 nm) stress: what are the key regulators? *Plant Growth Regul* 32: 27–39.

Anonim 2003. Leaf Area Measurement 1.3. The University of Sheffield, UK.

Anonim 2017. SPSS 17.0 for Windows. SPSS Inc., New York.

Bernal M, Llorens L, Badosa J, Verdager D 2013. Interactive effects of UV radiation and water availability on seedlings of six woody Mediterranean species. *Physiol Plant* 147: 234–247.

Boerner REJ, Koslowsky SD 1989. Microsite variations in soil chemistry and nitrogen mineralization in a beechmaple forest. *Soil Biol Biochem* 21: 795–801.

Bussotti F 2008. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. *Glob Change Biol* 14: 2727–2739.

Bussotti F, Bettini D, Grossoni P, Mansuino S, Nibbi R, Soda C, Tani C 2002. Structural and functional traits of *Quercus ilex* in response to water availability. *Environ Exp Bot* 47: 11–23.

Bussotti F, Ferrini F, Pollastrini M, Fini A 2014. The challenge of Mediterranean sclerophyllous vegetation under climate change: from acclimation to adaptation. *Environ Exp Bot* 103: 80–98.

Cornelissen JHC, Lavorel S, Garnier E, Diaz S, Buchmann N, Gurvich DE, Reich PB, ter Steege H, Morgan HD, van der Heijden MGA, Pausas JG, Poorter H 2003. A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Aust J Bot* 51(4): 335–380.

Davis PH 1978. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Edinburg Univ.

Díaz-Guerra L, Llorens L, Bell TL, Font J, González JA, Verdager D 2019. Physiological, growth and root biochemical responses of *Arbutus unedo* and *Quercus suber* seedlings to UV radiation and water availability before and after aboveground biomass removal. *Environ Exp Bot* 168: 103861.

Frohnmeier H, Staiger D 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol* 133: 1420–1428.

Garnier E, Cortez J, Billes G, Navas ML, Roumet C, Debussche M, Laurent G, Blanchard A, Aubry D, Bellmann A, Neill C, Toussaint JP 2004. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* 85: 2630–2637.

Gratani L, Ghia E 2002. Adaptive strategy at the leaf level of *Arbutus unedo* L. to cope with Mediterranean climate. *Flora* 197(4): 275–284.

Jullien A, Allirand JM, Mathieu A, Andrieu B, Ney B 2009. Variations in leaf mass per area according to N nutrition, plant age, and leaf position reflect ontogenetic plasticity in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crop Res* 114(2): 188–197.

Jurik WT 1986. Temporal and spatial patterns of specific leaf weight in successional northern hardwood tree species. *Amer J Bot* 73(8): 1083–1092.

Karadeniz T, Kurt H, Kalkışım Ö 1996. Yomra (Trabzon) çevresinde yetişen kocayemiş (*Arbutus unedo* L.) tiplerinin meyve özellikleri üzerinde çalışmalar. *YYÜZF Dergisi*. 6(4): 65–70.

Korkmaz H, Yalcın E, Kutbay HG, Berk E, Bilgin A 2008. Contribution to the knowledge of the syntaxonomy and ecology of macchie and forest vegetation in Paphlagonia, North Anatolia, Turkey. *Acta Bot. Gallica* 155: 495–512.

Kraft NJB, Valencia R, Ackerly DD 2008. Functional traits and niche-based tree community assembly in an amazonian forest. *Science* 322(5901): 580–582.

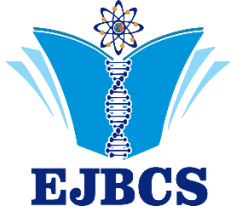
Kutbay HG, Yalcın E, Bilgin A 2003. Foliar N and P resorption and foliar nutrient concentrations in canopy and subcanopy of a *Fagus orientalis* Lipsky forest. *Belg J Bot* 136: 35–44.

Lavorel S, Díaz S, Cornelissen JHC, Garnier E, Harrison SP, McIntyre S, Pausas JG, Pérez-Harguindeguy N, Roumet C, Urcelay C 2006. Plant functional types; are we getting any closer to the Holy Grail? In: Canadell J, Pitelka LF, Pataki D (Ed.), *Terrestrial ecosystems in an changing world*. Heidelberg: Springer – Verlag.

Li FR, Peng SL, Chen BM, Hou YP 2010. A meta-analysis of the responses of woody and herbaceous plants to elevated ultraviolet-B radiation. *Acta Oecol* 36: 1–9.

Matesanz S, Valladares F 2014. Ecological and evolutionary responses of Mediterranean plants to global change. *Environ. Exp Bot* 103: 53–67.

- Milla R, Castro-Diez P, Montserrat-Marti G 2009. Phenology of Mediterranean woodyplants from NE Spain: Synchrony, seasonality and relationships among phenophases. *Flora* 205: 190-199.
- Milla R; Reich PB 2008. Environmental and developmental controls on specific leaf area are little modified by leaf allometry. *Funct Ecol* 22(4): 565-576.
- Misson L, Tu KP, Boniello RA, Goldstein AH 2006. Seasonality of photosynthetic parameters in a multi-specific and vertically complex forest ecosystem in the Sierra Nevada of California. *Tree Physiol* 26: 729-741.
- Nouvellon Y, Laclau JP, Epron D, Kinana A, Mabilia A, Rouspard O, Bonnefond JM, le Maire G, Marsden C, Bontemps JD, Saint-Andre L 2010. Within-stand and seasonal variations of specific leaf area in a clonal Eucalyptus plantation in the Republic of Congo. *Forest Ecol Manag* 259: 1796-1807.
- Orgeas J, Ourcival JM, Bonin G 2002. Seasonal and spatial patterns of foliar nutrient in cork oak (*Quercus suber* L.) growing on siliceous soils in province (France). *Plant Ecol* 164: 201-211.
- Prior LD, Bowman DMJS, Eamus D 2004. Seasonal differences in leaf attribute in Australian tropical tree species: family and habitat comparisons. *Funct Ecol* 18: 707-718.
- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS 1992. Leaf life-span in relation to leaf, plant and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecol Monogr* 62(3): 365-392.
- Sardans J, Peñuelas J 2012. The role of plants in the effects of global change on nutrient availability and stoichiometry in the plant-soil system. *Plant Physiol* 160: 1741-1761.
- Sardans J, Peñuelas J 2013. Plant-soil interactions in Mediterranean forest and shrublands: impacts of climatic change. *Plant Soil* 365: 1-33.
- Sellin A 2001. Morphological and stomatal responses of Norway spruce foliage to irradiance within a canopy depending on shoot age. *Environ Exp Bot* 45: 115-131.
- Sperlich D, Chang CT, Peñuelas J, Gracia C, Sabate S 2015. Seasonal variability of foliar photosynthetic and morphological traits and drought impacts in a Mediterranean mixed forest. *Tree Physiol* 35(5): 501-520.
- Sürmen B, Kutbay HG, Çakmak A, Yılmaz H 2016. Comparison of Leaf Traits (SLA And LMA) on Different Populations of *Alcea apterocarpa*. *Hacettepe J Biol Chem* 44(2): 125-131.
- Turner NC, Schulze ED, Nicolle D, Schumacher J, Kuhlmann I 2008. Annual rainfall does not directly determine the carbon isotope ratio of leaves of *Eucalyptus* species. *Physiol Plant* 132: 440-445.
- Valladares F, Sánchez-Gómez D 2006. Ecophysiological traits associated with drought in Mediterranean tree seedlings: individual responses versus interspecific trends in eleven species. *Plant Biol* 8: 688-697.
- van Heerwaarden LM, Toet S, Aerts R 2003. Current measures of nutrient resorption efficiency lead to a substantial underestimation of real resorption efficiency: facts and solutions. *Oikos* 101: 664-669.
- Varol Ö 2003. Flora of Başkonuş Mountain (Kahramanmaraş). *Turk J Bot* 27: 117-139.
- Verdaguer D, Llorens L, Bernal M, Badosa J 2012. Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiation on leaves of six Mediterranean sclerophyllous woody species subjected to two different watering regimes at the seedling stage. *Environ Exp Bot* 79: 66-75.
- Walters MB, Kruger EL, Reich PB 1993. Growth, biomass distribution and CO₂ exchange of northern hardwood seedlings in high and low light: relationships with successional status and shade tolerance. *Oecologia* 94: 7-16.
- Wang G 2007. Leaf trait co-variation, respond and effect in a chronosequence. *J Veg Sci* 18(4): 563-570.
- Wright IJ, Reich PB, Cornelissen JHC, Falster DS, Garnier E, Hikosaka K, Lamont BB, Lee W, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Villar R, Warton DI, Westoby M 2005. Assessing the generality of global leaf trait relationships. *New Phytol* 166(2): 485-496.
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen M, Diemer J, Flexas E, Garnier PK, Groom J, Gulias JHC, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley JJ, Navas ML, Niinemets U, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov VI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428(6985): 821.
- Wright IJ, Westoby M 2003. Nutrient concentration, resorption and lifespan: leaf traits of Australian sclerophyll species. *Funct Ecol* 17: 10-19.
- Yılmaz H 2009. Ünye Asarkaya ormanındaki baskın ağaç ve çalı türlerinde azot ve fosfor geri alınımı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Yılmaz H, Kutbay HG, Kiliç DD, Surmen B 2014. Foliar nitrogen and phosphorus resorption in an undisturbed and *Pinus pinaster* Ait. planted forests in Northern Turkey. *Rev Écol (Terre Vie)* 69: 39-48.



Sisplatin ve valproik asitin indüklediği toksisiteye karşı kudret narının *Drosophila melanogaster*'in yaşama yüzdesi ve ömür uzunluğu üzerine etkisi

Çağla Ersöz¹ , Deniz Altun Çolak^{2*} 

¹Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan, Türkiye

²Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye

*Corresponding author : dnz_altun@yahoo.com

Orcid No : <https://orcid.org/0000-0002-3576-0355>

Received : 12/09/2019

Accepted : 13/10/2019

Özet: Kemoterapide, kanser hücrelerini öldürmek için sitotoksik antineoplastik ajanlar başrolde. Antikonvülsan kullanan hastalar antineoplastik bir ajanı da kullanmayı gerektiren kanser tedavi sürecine girebilmektedir. Antineoplastiklerin toksik etkisinin, birlikte uzun süreli kullanılan anti epileptiklerle daha çok arttığı bilinmektedir. Bilimsel ilerlemeler ve eczacılık tekniklerinin gelişmesiyle bitkilerin tedavi edici değere sahip etken maddeleri kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanılmıştır. Bu çalışmada, sisplatin ve valproik asitin uzun süreli kullanımlarının meyve sineklerinin yaşama yüzdesi ve ömür uzunlukları üzerindeki olası toksik etkinin kudret narı ile giderilip giderilmeyeceği araştırılmıştır. Bu amaçla, kontrol, 0.05mM valproik asit, 0.05mM sisplatin ile 2.5 ve 5mg/mL kudret narının çekirdek ve meyvelerine ait metanol ekstraktlarını içeren deney setleri hazırlanmıştır. Ömür uzunluğu deneyleri, *Drosophila melanogaster*'in Oregon R soyuna ait dişi ve erkek popülasyonlarında ayrı ayrı çalışılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sonuçların istatistiksel analizleri için tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Çalışmamızda valproik asit ve sisplatin maruz kalan hem dişi hem de erkek popülasyonlarda ömür uzunluğu ve yaşama yüzdesi bakımından kontrole göre önemli bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Kudret narının çekirdek ve meyve ekstraktlarının valproik asit ve sisplatinle birlikte uygulandığı deney gruplarında yaşama yüzdesi ve ömür uzunluğu değerlerinin kontrole yaklaştığı gözlenmiştir. Sisplatin+valproik asit grubunda daha fazla olduğu gözlenen toksik etkiye karşı kudret narının koruyucu etkisinin, bitkinin sahip olduğu bileşenlerin yüksek antioksidan aktivitelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, valproik asit, sisplatin, kudret narı, ömür uzunluğu, yaşama yüzdesi

The effect of bitter melon against cisplatin and valproic acid-induced toxicity on the percentage of survival and lifespan in Drosophila melanogaster

Abstract: In chemotherapy, cytotoxic antineoplastic agents play a leading role in killing cancer cells. Patients using anticonvulsants may also undergo cancer treatment which requires the use of an antineoplastic agent. It is known that the toxic effect of antineoplastics increases during a long time with using anti epileptics. With the advancement of scientific advances and the development of pharmaceutical techniques, the therapeutic agents of plants have been used in the treatment of many diseases such as cancer. In this study, it was investigated whether the long-term use of cisplatin and valproic acid can be eliminated with bitter melon by the possible toxic effect on the survival rate and lifespan of fruit flies. For this purpose, control and application sets containing 0.05mM valproic acid and 0.05mM cisplatin and methanol extracts of 2.5 and 5mg/mL bitter melon were prepared. Lifespan experiments were separately studied in male and female populations of the Oregon R strain of *Drosophila melanogaster*. One-way analysis of variance was used for statistical analysis of control and application groups. In our study, a significant decrease was found in both female and male populations exposed to valproic acid and cisplatin in terms of lifespan and survival rates compared to the control. It was observed that the survival percentage and lifespan closed to the control group in the experimental groups where bitter melon extracts with valproic acid and cisplatin. It is thought that the protective effect of bitter melon against the toxic effect observed in cisplatin+valproic acid group is due to the high antioxidant activities of the plant components.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, valproic acid, cisplatin, bitter melon, lifespan, survival percentage

1. Giriş

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve anormal şekilde yayılımı ile karakterize olan hastalıklar grubunda tanımlanmaktadır (Platin, 1996). Günümüzde kanser tedavisinde, kanser tanısı konan hastaların bireysel özellik ve hastalık durumuna göre kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve immünoterapi yöntemlerinden bir veya birkaçı kullanılmaktadır. Ancak kullanılan yöntemlere bağlı olarak tedavi ile ilgili zorluklar ve toksik etkiler de söz konusudur. Özellikle radyoterapi ve kemoterapi normal hücrelere de zarar vermektedir (Kızılcı, 1999, Cetik ve ark., 2015). Epilepsi, kronik ve paroksizmal seyirli genç yaşta başlayarak belirli kişilik bozukluklarına neden olduğu tartışılan ve hastaların iş ve sosyal yaşamlarını kötü yönde etkileyen kronik bir hastalıktır (Çetin ve ark., 1991). Kanserli hastalarda gözlenen epileptik nöbetler gibi nörolojik sorunlar, hem kansere hem de uygulanacak tedaviye bağlı olarak gelişebilir (Aydın ve Sohtaoğlu, 2015). Beyin tümörlü hastalardaki epilepsi sıklığı %30 ila 70 arasında değiştiği ve böyle hastalarda hastalarda epilepsi oluşma riskinin tümör tipine de bağlı olduğu bildirilmiştir (Genç ve ark., 2013). Birçok hastanın uzun süre ve bazen ömür boyu antiepileptik ilaç (AEİ) kullanması gerekmektedir. Antiepileptik ilaç kullanan hastalarda diğer yan etkilerin yanı sıra uzun vadeli kullanımda toksik hasarlara sebep olduğu tespit edilmiştir (Özemer ve Yalçın, 2017). Kanser hastalarında antineoplastik kemoterapinin gelişmesi ve destek tedavisi ile mortalite ve morbidite oranlarının önemli ölçüde azalması ve hastaların yüksek dozda sitotoksik ilaçların kullanılması ve hastaların uzun süreli tedavileri ilaçların yan etkilerini artırmaktadır (Meister ve Meadows, 1993, Cetik ve ark., 2015). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların temel prensipleri; hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeden mikrop veya tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya yok etmektir. İlaçlar, hem normal hem de kanserli hücrelerin gelişmesi ve çoğalmasını önlemek amacıyla kullanılır (Kayaalp, 2000). Kemoterapi ilaçları, etki özellikleriyle ilgili olarak, bireyde rahatsızlık verici birçok yan etkilere yol açabilmektedir (Thompson ve ark., 1997, White ve Schaefer, 2001). Bu gibi sitotoksik ilaçlara bağlı toksisite en sık görülen yan etkilerden birisidir. Antimetabolitler, alkilleyici ajanlar, antineoplastikler, antiepileptikler ve antrasiklinler en sık sitotoksisiteye neden olan ilaçların başındadır (Eren ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda, kanser hastaları arasında psikiyatrik hastalık sıklığının oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir. Kanser hastalarının büyük bir kısmında psikiyatrik bozukluklar, hastalığa tepki olarak ortaya çıkabildiği gibi kanser tanısı öncesi var olan psikiyatrik bozuklukların alevlenmesi de söz konusudur (Güleç ve Büyükkınacı, 2011). Bunun yanı sıra, Alzheimer hastalığı, bipolar bozukluk, meme ve prostat kanser genleri, 13 nolu kromozomun akrosentrik bölgesinde birlikte yer almaktadır. Bipolar bozukluğu olan bireyler arasında, meme kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir. Bu iki hastalık mekanizması çift taraflı etki göstererek birbirlerini tetikleyebilmektedir (Kesebir ve Bayrak, 2012).

Birçok çalışmada antioksidanların kemoterapiye bağlı toksisite şiddeti ve sıklığını azalttığı bildirilmektedir (Christen ve ark., 2000). Literatürde antioksidanların kemoterapiye bağlı toksisiteyi azaltarak, daha yüksek ve etkin dozların kullanılabilmesi için yer almaktadır (Blumenthal ve ark., 2000; Simone ve ark., 2007; Block ve ark., 2008; Cetik ve ark., 2015; Borek, 2017). Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (Akkuş, 1995; Gultekin ve ark., 2001; Mates, 2000; Mercan, 2004). Kanser ve epilepsi gibi birbirlerini de tetikleyebilen hastalıklarda kullanılan ilaçların oluşturduğu toksisite üzerine antioksidan maddelerin etkilerinin aydınlatılması ve daha ileri düzeyde araştırmaların yapılması gerekmektedir. Kudret narı olarak bilinen ve içerdiği fenolik bileşenleri sayesinde kuvvetli antioksidan özellik gösteren *Momordica charantia*, antidiyabetik, antikanser, anti-inflamasyon, antiviral ve kolesterol düşürücü etkilere de sahiptir (Semiz ve Şen, 2007; Budrat ve Shotipruk, 2008; Jagessar ve ark., 2008; Haque ve ark., 2011; Top, 2018). Çalışmamızda meyve sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster*'in yaşama yüzdesi ve ömür uzunluğu üzerinde antineoplastik bir ajan olan sisplatin ve antikonvülsan olarak alınan valproik asitin birlikte kullanımında oluşacak toksik etkilere karşı son yıllarda önemi giderek artan kudret narının koruyucu etkisi araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyalleri

Çalışmada kullanılan *Momordica charantia* ticari olarak alınmış ve teşhis ettirilmiştir. Bitki çekirdek ve meyve ekstresi elde etmek için maserasyon yöntemi uygulanmıştır.

2.2. Kimyasallar

Cisplatin (CAS:15663) ve Valproic acid (CAS: 9966-1) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Sisplatin (CP), valproik asit (VPA) ve kudret narının *Drosophila melanogaster* larvaları üzerinde yapılan 24 saatlik uygulamalar sonucunda tespit edilen LD₅₀ dozuna göre, çalışma konsantrasyonları CP ve VPA için 0.05mM; koruyucu olarak kullanılan kudret narının çekirdek ve meyvelerine ait metanol ekstraktları için ise 2.5 ve 5mg/mL olarak belirlenmiştir.

2.3. Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Deneyleri

Drosophila melanogaster'in *Oregon R* soyuna ait 3. evre (72±4 saat) larvalar kullanılarak yaşama yüzdesi deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla, önceden stok halinde elde edilmiş 1-3 günlük çiftleşmemiş *Drosophila* bireylerinin ♀♀ X ♂♂ olacak şekilde taze besiyerlerine aktararak 3 gün boyunca 25±1°C ve %40- 60 bağıl neme sahip etüvde beslenmesi sağlanmıştır. 3. günün sonunda uygulama grupları için toplanan her 100 larva 0.05mM dozunda CP, VPA ile farklı konsantrasyonlarda (2.5 ve 5mg/mL) *Momordica charantia* meyve (MCF) ve *Momordica charantia* çekirdek (MCS) içeren Standart *Drosophila* Besiyerine (SDM) aktarılmıştır. Tüm deney grupları her gün kontrol edilerek ilk ergin birey çıkışından itibaren 7 gün boyunca sayılarak bireyler

cinsiyete göre not edilmiştir. Tüm deneyler 3 kez tekrar edilmiştir.

2.4. Ömür Uzunluğu Deneyleri

Drosophila melanogaster'in ömür uzunluğu üzerine sisplatin, valproik asit ve kudret narının etkisi dişi ve erkek populasyonlarında ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu amaçla, aynı yaştaki bireyleri elde etmek için, taze besin ortamı içeren besiyerlerinde çaprazlamalar yapılarak stoklar oluşturulmuştur. Çaprazlamadan yaklaşık 10 gün sonra pupadan çıkan aynı yaşlı (1-3 günlük) virjin dişi bireyler ile erkek bireylerden her uygulama grubu için 100 birey toplanmıştır. Toplanan bireyler boş tüplere alınarak uygulamadan 2 saat önce aç bırakılmıştır. Daha sonra bu bireyler CP, VPA, MCF ve MCS maddelerini içeren kültür tüplerinde 2 saat beslenmişlerdir. Deney boyunca etüvde muhafaza edilen bireyler takip edilerek haftada iki kere besiyeri değişimi yapılmıştır. Birey sayıları her uygulama günü başlangıcı ve sonunda kontrol edilerek ölen bireyler kaydedilmiş ve ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarında sayım ve besiyeri değişimine son birey ölene kadar devam edilmiştir.

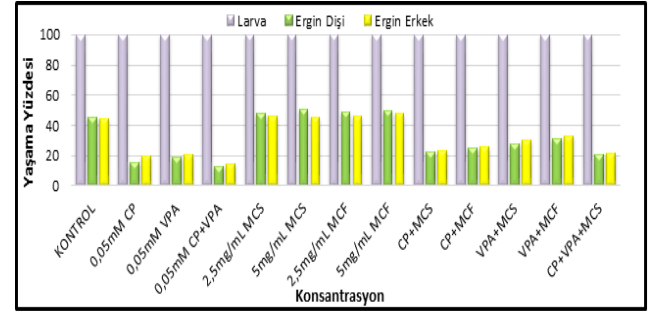
İstatistiksel Analiz: Yapılan deneylerden elde edilen verilerle ilgili istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 22.0 programı ile yapılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarının yaşama yüzdeleri ve ortalama ömür uzunluğu değerlerini karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde $p<0.05$ ve $p<0.01$ değeri dikkate alınmıştır. Hayatta kalış eğrileri ile F_1 nesillerine ait birey sayılarını gösteren grafikler de Microsoft Windows Office- Excel programı kullanılarak çizilmiştir.

3. Bulgular

Tablo 1. CP, VPA, MCS ve MCF uygulanan *D. melanogaster*'in ♀♀ ve ♂♂ populasyonlarına ait ortalama ömür uzunlukları ve gruplar arası önem kontrolleri

Uygulama Grupları ve Grup No	♀♀ N	YY (%)	Max. Ömür	Ortalama Ömür Uzunluğu±SH	Gruplar arası önem kontrolü (sadece anlamsız farklar)	♂♂ N	YY (%)	Max. Ömür	Ortalama Ömür Uzunluğu±SH	Gruplar arası önem kontrolü (sadece anlamsız farklar)
KONTROL (1)	100	46	74	70.68±1.6		100	45	76	73.31±0.96	
0.05mM CP (2)	100	16	27	19.10±0.81		100	20	30	20.85±0.92	
0.05mM VPA (3)	100	19	33	22.85±1.07	1-6*	100	21	36	25.22±1.14	1-6*
CP+VPA (4)	100	13	22	13.04±0.58	1-7*	100	15	25	13.64±0.67	1-7*
2.5mg/mL MCS (5)	100	48	75	65.59±1.69	1-8*	100	47	75	66.19±1.5	1-8*
5.0mg/mL MCS (6)	100	51	76	69.03±1.44	5-6*	100	47	77	70.39±1.34	5-6*
2.5mg/mL MCF (7)	100	49	77	68.43±1.53	5-7*	100	47	76	70.02±1.25	5-7*
5.0mg/mL MCF (8)	100	50	79	72.05±1.41	6-7*	100	48	78	71.95±1.27	6-7*
CP+MCS (9)	100	23	44	34.36±1.38	6-8*	100	24	46	37.42±1.38	6-8*
CP+MCF (10)	100	25	47	37.10±1.40	7-8*	100	26	49	41.61±1.36	7-8*
VPA+MCS (11)	100	28	51	42.10±1.57	9-10*	100	31	52	43.76±1.58	9-10*
VPA+MCF (12)	100	32	54	45.01±1.62	11-12*	100	33	56	47.30±1.70	11-12*
					13-14*					13-14*

Bu çalışmanın ilk aşamasında, CP ve VPA toksisitesine karşı kudret narının koruyucu etkisi *D. melanogaster*'de yaşama yüzdesi deneyleri ile araştırılmış, ikinci aşamasında ise meyve sineklerinin ömür uzunluğu üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Uygulama gruplarına ait larval mortalite oranları incelendiğinde, CP toksisitesinin VPA toksisitesinden daha fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte MCF ekstraktının MCS ekstraktına göre daha fazla koruyuculuğunun olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).



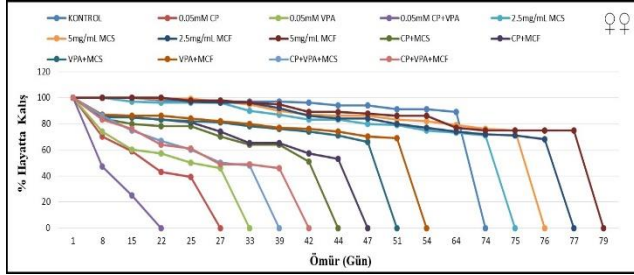
Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda CP, VPA, MCS ve MCF uygulanan *D. melanogaster*'de larval mortalite oranı

Yaşama yüzdesi deneylerinde CP ve VPA gruplarında larval mortalitenin arttığı, bu gruplarda dişi bireylerin erkeklere oranla daha fazla etkilendiği, CP ve VPA ile birlikte MCF ve MCS uygulanan gruplarda konsantrasyon artışına paralel olarak yaşama yüzdesi değerlerinin kontrole yaklaştığı gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 1, Tablo 1).

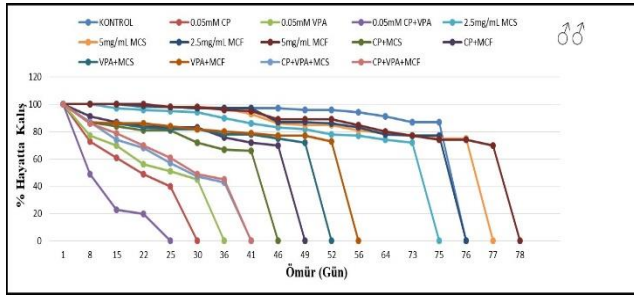
Çalışmamızda yalnızca CP ve VPA uygulanan gruplarda hem dişi hem de erkek bireylerde ömür uzunluğu kontrole göre azalırken, CP ve VPA ile birlikte MCF ve MCS uygulanan gruplara ait tüm bireylerde ortalama ömür uzunluğunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 1, Şekil 2 ve Şekil 3).

CP+VPA+MCS (13)	100	21	39	28.36±1.17	100	22	41	29.13±1.23
CP+VPA+MCF (14)	100	22	46	29.53±1.33	100	24	41	29.89±1.22

CP: Sisplatin, VPA: Valproik asit, MCS: *Momordica charantia* çekirdek, MCF: *Momordica charantia* meyve, YY: Yaşama yüzdesi, Max.: Maksimum, SH: Standart hata, N: Birey sayısı *: Gruplar arasındaki fark p>0.05 düzeyinde önemsizdir.



Şekil 2. Ergin yaşamları süresince farklı konsantrasyonlarda CP, VPA, MCS ve MCF içeren besiyerinde yaşayan *D. melanogaster*'in dişi bireylerine ait hayatta kalış eğrileri



Şekil 3. Ergin yaşamları süresince farklı konsantrasyonlarda CP, VPA, MCS ve MCF içeren besiyerinde yaşayan *D. melanogaster*'in erkek bireylerine ait hayatta kalış eğrileri

4. Tartışma ve Sonuç

Literatürde CP'nin toksisitesi üzerine yeterli sayıda veri olmasına karşın VPA ve *Momordica charantia* ile yapılan çalışmaların sayısının az olduğu görülmüştür. Toksik ve koruyucu etkileri olan bu maddeler ilk kez birlikte kullanılmış ve yapılan bu çalışmayla toksik ilaçların birlikte kullanımı konusunda kaçınılması gereken noktalarla, kudret narının koruyucu etkisi üzerine yeni bir yaklaşım getireceği gösterilmiştir.

Sisplatinin tek başına veya diğer antineoplastik ajanlarla ya da radyoterapi ile birlikte testis, over, mesane, prostat, serviks, özofagus, akciğer kanseri, ağız, baş-boyun kanserleri gibi solid tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanıldığı, ayrıca sisplatinin iyileştirici etkisinin yanında toksik etkisinin de olduğu rapor edilmiştir (Boulikas ve Vougiouka, 2003). Çalış (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, antikonvülsan etkili ilaçların bir bölümü olan antiepileptiklerin merkezi sinir sistemini seçici olarak deprese eden ilaçlar olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu ilaçların kemik iliği depresyonu, karaciğer ve böbrek tahribatı, gastrointestinal rahatsızlıklar, uyuşukluk ve sitotoksik hasar oluşturabilecek yan etkilere sahip olduğu da belirtilmiştir. Antineoplastiklerin antiepileptiklerle birlikte uygulandığı tedavi yönteminde antineoplastiklerin toksik etkisinin daha da arttığı gözlenmiştir (Yeni ve Gürses, 2015). Can (2005), kuvvetli bir antineoplastik ajan olan

sisplatinin etki mekanizması ve yan etkilerini araştırarak, antineoplastiklerin tek başına veya farklı ilaç gruplarıyla birlikte kullanıldıklarında kalp, böbrek, solunum sistemi, karaciğer, üreme ve sinir sistemi hücreleri üzerinde hasara sebep olabileceğini ifade etmiştir. Yıldırım ve ark., (2010), 25 hasta ve 25 sağlıklı birey üzerinde antiepileptik ilaç olarak 50-100ng/mL valproik ve 4-12ng/mL karbamazepin kullandıkları bir çalışmada, bireylerde ilacın iştme, denge ve koordinasyon üzerine toksik etkilerini karşılaştırmış, klasik antiepileptik ilaçların (AEİ) denge ve koordinasyon üzerine kronik kullanımda kalıcı etkilerinin olduğunu, sisplatin kullanan hastalarda ise karbamazepin ve valproik asit seviyesinin azaldığını tespit etmiştir.

Ryu ve ark., (2012) tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, proteinleri upregüle edebilen ve valproik asit ile kombine HSV-TK (MSCs-TK) eksprese eden insan kemik iliği mezenşimal kök hücreleri kullanılarak gen terapisinin anti-glioma etkisi değerlendirilmiştir. Valproik asitin diğer ilaçlarla kombinasyon tedavisinin, tekli tedavi gruplarına kıyasla, tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği ve glioma taşıyan farelerin hayatta kalmasını uzattığı gösterilmiştir. İnsanlar ve deney hayvanlarında antiepileptik ilaçlardan valproik asitin epilepsi nöbetlerinde kuvvetli bir şekilde etkili olduğu fakat uzun süreli kullanımlarda ve farklı ilaç bileşimleriyle beraber kullanımının toksisiteyi artırarak vücutta hasar artışına sebep olduğu belirlenmiştir (Yeni ve Gürses, 2015).

Son yıllarda doğal kaynakların tedavi edici özelliklerinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kudret narı (*Momordica charantia* L.) içerdiği sağlığa yararlı bileşenler sayesinde şifalı bitkiler arasında kendine önemli bir yer edinmiştir. Bitki, meyve ve tohum özütlerinin birçok tıbbi öneme sahip olduğu ve sıklıkla alternatif tıp sisteminde kullanıldığı yapılan çalışmalar sayesinde bilinmektedir (Jayasooriya ve ark., 2000). Kudret narında bulunan fenolik bileşiklerin mikroorganizmalarda bulunan enzimleri inhibe ettikleri ve böylece zararlı etkilerini ortadan kaldırdıkları belirtilmiştir (Şahin, 2007; Kültür, 2007) Kudret narının kanser hücrelerinin oluşumunu ve gelişimini engelleyen proteinler içerdiği ifade edilmiştir (Ganguly ve ark., 2000). Momordin, alfa-momorcharin, beta-momorcharin, cucurbitacin B tümör oluşumunu önleyerek antikanserojenik etki göstermektedir (Grover ve Yadav, 2004; Taylor, 2002). Ray ve ark., (2010), *Momordica charantia* ekstraktının etkinliğini değerlendirmek için *in vitro* model olarak insan meme kanser hücrelerini, MCF-7 ve MDA-MB 231 ve insan meme epitel hücrelerini kullandıkları bir çalışmada kudret narının hücre proliferasyonunda ve apoptotik hücre hasarında belirgin bir düşüşe neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca kanserli hücrelerin büyümesinin engellenmesi için *Momordica charantia*'nın sinyal iletim yollarını modüle ettiği ve meme

kanserinin önlenmesi için bir diyet takviyesi olarak kullanılabileceğini ifade etmiştir. Araştırma bulgularından elde edilen sonuçların literatür ile örtüştüğü görülmektedir.

CP ve VPA uygulanan gruplarda yaşama yüzdesi ve ömür uzunluğu üzerinde gözlenen toksik etkiye karşı MCF ve MCS ekstrelerinin koruyucu etki göstermesinin muhtemel sebebinin sahip olduğu fenolik bileşenler olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma, günümüzde bitkisel tedavinin gelişmesine paralel olarak önem kazanan koruyucu etkili *Momordica charantia*'nın çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri konusunda literatüre katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

İlk yazarın Yüksek Lisans Tezi'nden veriler içeren ve Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (EBYUBAP) Birimi tarafından desteklenen FYL-2018-560 nolu projenin bir bölümü olan bu çalışma için desteklerinden ötürü EBYUBAP birimine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Akkuş İ 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, No: 38, Sağlık dizisi 5, Konya.

Aydın Ş, Sohtaoglu M 2015. Akciğer kanserine eşlik eden nörolojik sorunlar. Bulletin of Thoracic Surgery/Toraks Cerrahisi Bülteni 9(4):307-313.

Block KI, Koch AC, Mead MN, Tothy PK, Newman RA, Gyllenhaal C 2008. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. Int J Cancer 123(6): 1227-1239.

Blumenthal RD, Lew W, Reising A, Soyne D, Osorio L, Ying Z, Goldenberg DM 2000. Antioxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radio-immunotherapy. Int J of Cancer 86(2): 276-280.

Borek C 2017. Dietary antioxidants and human cancer. J Restor Med 6(1): 53-61.

Budrat P, Shotipruk A 2008. Extraction of phenolic compounds from fruits of bitter melon (*Momordica charantia*) with subcritical water extraction and antioxidant activities of these extracts. Chiang Mai Journal of Science, 35(1): 123-130.

Boulikas T, Vougiouka, M 2003. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. Oncol Rep 10(6): 1663-1682.

Can G 2005. Antineoplastik ilaçların yan etkileri ve hemşirelik yaklaşımları. HEAD 2(2): 8-15.

Christen WG, Gaziano JM, Hennekens CH 2000. Design of physicians: health study II--a randomized trial of beta-carotene, vitamins E and C, and multivitamins, in prevention of cancer, cardiovascular disease, and eye disease, and review of results of completed trials. Ann Epidemiol 10(2): 125-134.

Çalış Ü 2004. Antiepileptik İlaçlar. Farmasötik Kimya, Cilt I, Irmak Matbaası, Ankara, 326-347.

Cetik S, Ayhanci A, Sahinturk V 2015. Protective effect of carvacrol against oxidative stress and heart injury in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rat. Braz Arch Biol Technol 58(4): 569-576.

Çetin M, Ceylan ME, Özögretmen H, Şengezer A 1991. Epileptiklerde psikososyal durumun ve antiepileptik ilaçların kan düzeyleri ile klinik cevaplar arasındaki

ilişkinin araştırılması. Psikofarmakolojide Yenilikler Sempozyumu, İstanbul, 110-116.

Eren E, Ata A, Arıcan A 2012. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve nefrotoksisite. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 26(3): 229-235.

Grover JK, Yadav SP 2004. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. J Ethnopharmacol 93(1): 123-132.

Güleç G, Büyükkınacı A 2011. Kanser ve psikiyatrik bozukluklar. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar 3(2): 343-367.

Ganguly C, De S, Das S 2000. Prevention of carcinogen-induced mouse skin papilloma by whole fruit aqueous extract of *Momordica charantia*. Eur J Cancer Prevention, 9(4): 283-288.

Genç F, Kutlu G, Gömceli YB, İnan LE 2013. Ankara eğitim ve araştırma hastanesi epilepsi bölümünde düzenli takip edilen dirençli epilepsi hastalarının demografik ve klinik bulguları. Epilepsi 19(2): 79-84.

Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kılınc I 2001. *In vivo* changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Arch. Toxicol 75(2): 88-96.

Haque EM, Alam BM, Hossain SM 2011. The efficacy of cucurbitane type triterpenoids, glycosides and phenolic compounds isolated from *Momordica charantia*: a review. Int J Pharm Sci Rev Res 2 (5): 1135-1146.

Jagessar RC, Mohamed A, Gomes G 2008. An evaluation of the antibacterial and antifungal activity of leaf extracts of *Momordica charantia* against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Nature and Science, 6(1): 1-14.

Jayasoorya AP, Sakono M, Yukizaki C, Kawano M, Yamamoto K, Fukuda N 2000. Effects of *Momordica charantia* L. powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. J Ethnopharmacol 72(1-2): 331-336.

Kayaalp O 2000. Tıbbi Farmakoloji. Cilt: 1, Ankara, Feryal Matbaacılık, s.372, 378-380, 384-400.

Kesebir S, Bayrak A 2012. Bipolar Bozukluk ve Kanser. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar 4(2): 223.

Kızılcı S 1999. Kemoterapi alan kanserli hastalar ve yakınlarının yaşam kalitesini etkileyen faktörler. Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 3(2): 18-26.

Kültür Ş 2007. Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). J Ethnopharmacol 111(2): 341-364.

Meister LA, Meadows AT 1993. Late effects of childhood cancer therapy. Curr Probl Pediatr 23(3): 102-131.

Mercan U 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Van Vet J 15(1): 91-96.

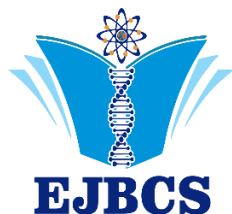
Platin N 1996. Hemşireler için kanser el kitabı. Onkoloji Hemşireliği Derneği, Ankara.

Ray RB, Raychoudhuri A, Steele R, Nerurkar P 2010. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. Cancer Res 70(5): 1925-1931.

Ryu CH, Park KY, Kim SM, Jeong CH, Woo JS, Hou Y, Jeun SS 2012. Valproic acid enhances anti-tumor effect of mesenchymal stem cell mediated HSV-TK gene therapy in intracranial glioma. Biochem Biophys Res Commun 421(3): 585-590.

Semiz A, Şen A 2007. Antioxidant and chemoprotective properties of *Momordica charantia* L. (Bitter melon) fruit extract. Afr J Biotechnol 6(3): 273-277.

- Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB 2007. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Altern Ther Health Med* 13(1): 22-28.
- Şahin G 2007. Türkiye'den toplanan bazı *Paeonia* türlerinin antibakteriyel etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Taylor L 2002. Technical data report for bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Herbal secrets of the rainforest*, 1-103.
- Thompson J, Nugent SMJ, Walczak RJ 1997. *Clinical Nursing*, 4th Ed., St Louis. Mosby, pp.1330-1331.
- Top R 2018. Bazı önemli tıbbi bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- White L, Schaefer KP 2001. *Foundations of Nursing: Caring for the whole person*. Texas, Delmar, pp. 659- 681.
- Yeni NS, Gürses C 2015. Epilepsi çalışma grubu tanı ve tedavi rehberi. Galenos Yayınevi, İstanbul.
- Yıldırım F, Çe P, Bilgin R, Gedizlioğlu M 2010. Karbamazepin, valproik asit ve levetirasetam kullanan epilepsi hastalarında denge koordinasyon testleri ve beyin sapı uyarılmış potansiyellerinin değerlendirilmesi. *Epilepsi Dergisi* 16(3): 161-166.



Investigation of nanoparticle use in geopolymer production

Begum Seda Ogun*, Emek Moroydor Derun

Yildiz Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Chemical Engineering Department, Istanbul, Turkey

*Corresponding author : begumseda@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-6786-3167>

Received : 13/09/2019
Accepted : 22/10/2019

Abstract: In this study, performance improvements of alumina nanoparticles of metakaolin based geopolymer samples were studied. It is aimed to develop a durable implant by combining the mechanical properties of inorganic polymers with the bioactive behavior of substances such as calcium hydroxide and calcium phosphate. This material, which is an example of high-tech engineering ceramics, has been calcined and it is used as an implant / prosthesis in biomedical fields as a result of improvement. It is foreseen that the production of biogeopolymer will provide hard / soft tissue and bone regeneration. One of the best ways to determine the bioactivity of biomaterials is to expose them to simulated body fluids. 7, 14 and 28-day cured sample surfaces were investigated using characterization of Scanning Electron Microscopy, X-Ray Diffraction and Fourier Transformed Infrared Spectrometry. As a result, in this study; the properties of alumina nanoparticles based metakaolin based geopolymer samples and their usefulness in the form of implant, bone substitutes as biocompatible materials were investigated and results were evaluated.

Keywords: Geopolymer, nanoparticle, alumina, metakaolin

© EJBACS. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, surgeons in medical practice areas increase the demand for new materials for application in cases of bone fractures or deficiencies caused by accidents, cysts, tumors and other bone diseases. (Korkusuz et al. 2011) These materials are produced from a variety of materials, such as organic or inorganic cements, with the main characteristics being biocompatibility, if possible, the ability to withstand bone regeneration and / or mechanical loading. In this study, it is aimed to develop a durable implant by combining the mechanical properties of inorganic polymers (geopolymers) with the bioactive behavior of substances such as calcium hydroxide and calcium phosphate. In order to increase the mechanical and biological performance of the synthesized geopolymer, alumina nanopowders were added. Geopolymer produced under the study will be expected to be used in biomedical areas as an implant / prosthesis after calcination.

Geopolymers are formed by mixing alkali or alkali-silica solutions of solid silicate-aluminate raw materials. (MacKenzie et al., 2007) The most important raw material is generally calcined clays, such as heat activated kaolin. (MacKenzie et al., 2010) Up to date, kaolinitic clays (Oudadesse et al., 2007), metakaolin, fly ash, blast furnace slag, fly ash-slag mixtures, metakaolin-fly ash mixtures, metakaolin slag mixtures, slag-red sludge mixtures, kaolin with fly ash and a kind of zeolite mineral Mixtures of non-

calcined substances such as stilbite (Ros and Shima, 2013) have been used. (Mohamed et al., 2016) In this study, raw material, calcined kaolin clay, ie, metakaolin, were used as the main phase of geopolymer mortar.

Before the incorporation of calcium phosphate and calcium hydroxide compounds into the material, metakaolin must be activated for the synthesis of geopolymer. Sodium silicate solution with potassium hydroxide and sodium hydroxide salts for geopolymerization was used as activator.

2. Materials and Method

2.1. Raw materials and characterization studies

Chemicals used in material preparation; metakaolin clay, sodium hydroxide, potassium hydroxide, sodium silicate, pure water, calcium hydroxide, calcium phosphate, nano alumina powder, chitosan, acetic acid solution and hydroxy apatite. X-ray diffraction and Fourier transformed infrared spectroscopy instrumental characterization methods were applied to the metakaoline raw material supplied.

2.2. Preparation of Reference Geopolymer Samples

Metakaolin-based geopolymer samples containing calcium hydroxide and calcium phosphate powders were activated with the alkali salts of sodium and potassium hydroxide. Powdered chemicals containing metakaolin and calcium

were first weighed. Weighing was continued with granular salts. At this stage, sodium and potassium hydroxide were weighed and then dissolved in some water. After activation of these materials with metakaolin, salt and sodium silicate, the appropriate amounts of calcium-containing components were added. Homogenization is essential here.

In the casting process, silicon molds with 30mm diameter and 20mm height are thoroughly cleaned and lubricated. The samples poured into the molds are compressed in the shaker to prevent air pockets. Samples that were kept at room temperature for 24 hours were kept in the curing pool for 3, 7, 28 days by removal from the mold.

Prepared geopolymer samples were named GP 1, 2, 3 and 4 according to their alkali salt and calcium content. GP1 and GP3 were activated with potassium hydroxide, GP2 and GP4 sodium hydroxide salt. GP1 and GP2 contain calcium hydroxide, GP3 and GP4 calcium phosphate. The x-ray diffraction (XRD) and Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) instrumental characterization methods were applied to these reference samples.

2.3. Strength Measurements

The compressive strength of geopolymer samples was tested with 3, 7, 14 and 28 days curing according to ASTM C109 and ASTM C191 (Annual Book of ASTM Standard, 2005) standards. Strength measurements were performed using a universal tensile compression device from Mohr Federhaff AG.

3. Results

The XRF results of the chemical composition of the metakaolin clay we use as raw material in all of the geopolymer samples are as follows.

Table 1. Chemical Composition of Metakaolin Clay

Percentage %					
SiO ₂	Al ₂ O ₃	K ₂ O	Na ₂ O	Fe ₂ O ₃	TiO ₂
59.80	35.20	0.7	0.6	1.2	1.5

The co-occurrence of reference geopolymer samples with the XRD analysis result for metakaolin is as follows. Either way, the upper spectrum is red and belongs to GP1 and GP2, respectively. The underlying spectrum is blue and belongs to metakaolin.

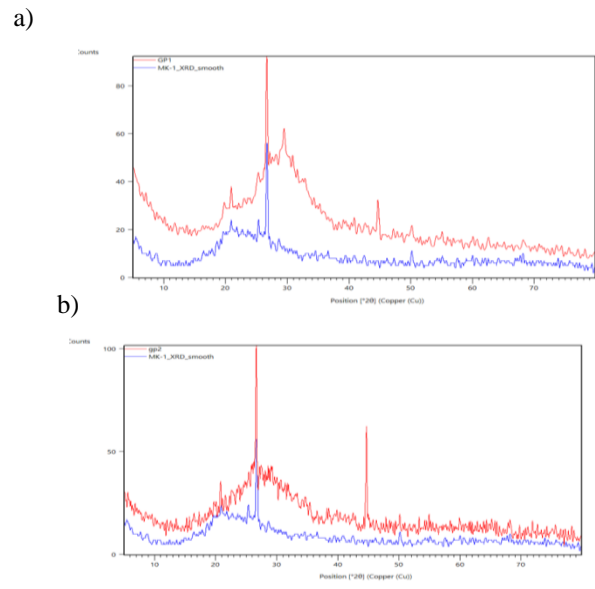


Figure 1. a) GP1 and Metakaolin XRD Spectrum, b) GP2 and Metakaolin XRD Spectrum

When evaluating the XRD analysis results, phase identification for the reference geopolymer samples was carried out.

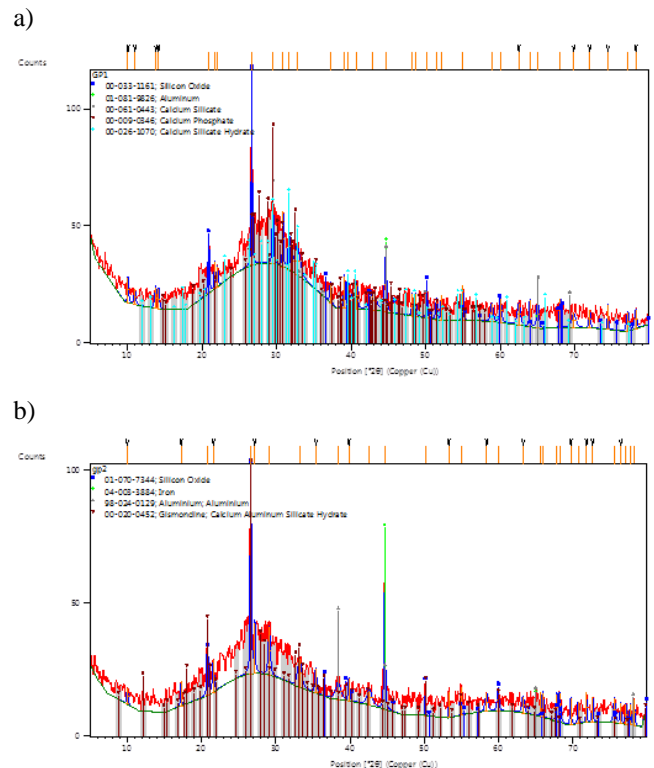


Figure 2. a) GP1 Phase identification, b) GP2 Phase identification

XRD spectra obtained from geopolymers including calcium components based on metakaolin and metakaolin are shown in Figures 1 a and b. In both ways, blue-colored spectra were observed in metakaolin clay and geopolymeric structure with red colored spectrum. When the spectra of metakaolin raw material and geopolymer samples were evaluated together, some phases were lost and it was observed that amorphous structure was formed with quartz. X-ray analysis parameters are 2θ and $10^\circ - 80^\circ$. The sloppy slope-shaped slope obtained from the analyzes shows that the metakaolin clay is an amorphous material (Barbosa et al., 2000). The amorphous structure of the metakaoline, which is used as the raw material, is closely related to the geopolymer amorphous structure. Therefore, it is not possible to say that the structure is a geopolitical structure. In order to support this finding, structural analyzes such as FTIR are needed.

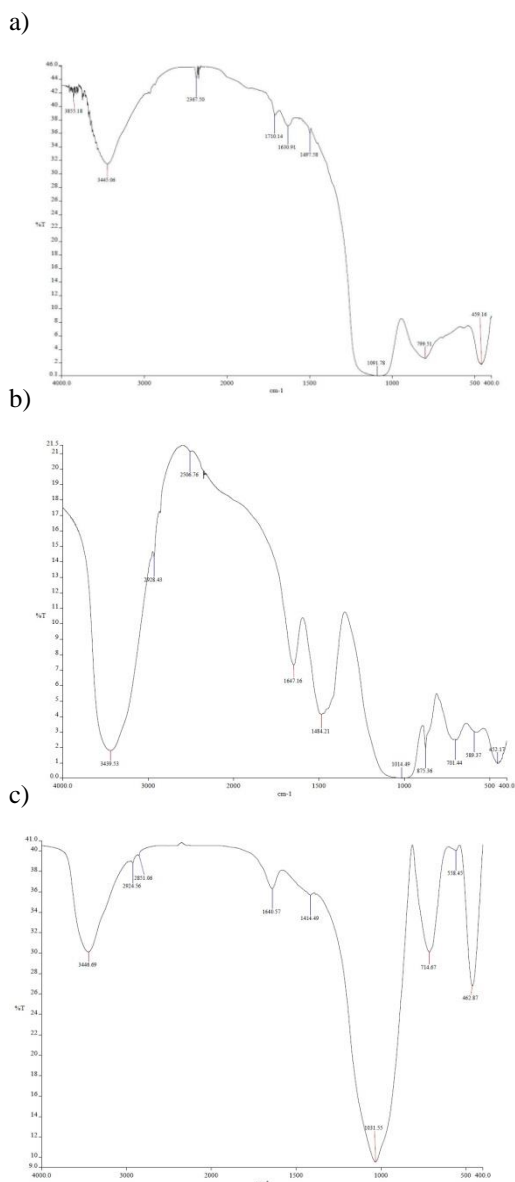


Figure 3. a) Metakaolin FTIR spectrum, b) GP1 (Non-calcined geopolymer sample) FTIR spectrum, c) GP2 (Calcined geopolymer sample) FTIR spectrum

FT-IR spectroscopy is used to identify the variety of metakaolin clay and geopolymer materials. Molecular structures containing Si–O–Si and Al – O bonds have been defined in geopolymeric structures. Metakolin and calcium containing references and FTIR analyzes of calcined geopolymers at 750°C are given in Figure 3 a, b and c, respectively.

The peaks of water added to the geopolymer material are shown in Figures 3 b and c. The bands in the $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ wave number region are due to the structure-dependent water molecules. Geopolymerization increased water molecules. The peaks in the $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ wave number indicate the H-O-H tendency (Lee and Van Deventer, 2002).

The peaks around the 700 cm^{-1} wave number represent the Si-O symmetric vibration band. The peaks around the $580\text{-}590\text{ cm}^{-1}$ wave number refer to Si-O-Si or Si-O-Al symmetric strain. Si-O-Si or Si-O-Al network structure is observed around 450 peaks.

Strength measurements; the reference geopolymer was carried out at 500°C and 750°C on calcined and fully cured samples. The average tensile strength of the samples tested is shown in Table 2.

Table 2. Tensile strength measurement results of geopolymer samples

TENSILE STRENGTH [MPa]			
SAMPLES	Unheated	500 °C	750 °C
Nano Al ₂ O ₃ powder GP	3.10 (0.32)	1.99 (0.75)	0.80 (0.44)
Ca-hydroxide GP	4.35 (0.46)	0.68 (0.57)	0.97 (0.39)
Ca-phosphate GP	3.61 (0.42)	4.04 (0.85)	1.21 (0.65)

Samples with calcium hydroxide measured in 15 samples with the highest average strength among the reference samples followed by samples containing calcium phosphate and reference geopolymers (4.35, 3.61 and 3.10 MPa) respectively. The reference geopolymer resistance without calcium or nanoparticle having a tensile strength of 3.10 MPa is the lowest sample.

The lowest tensile strength (0.68 MPa) is the sample containing calcium hydroxide. The reason is that it has developed surface cracks before the test in the sample. Reference geopolymer samples were obtained with a tensile strength of 1.99 MPa. Samples containing calcium phosphate were obtained as 4.04 MPa. It describes the higher strength of the calcium phosphate containing sample in the alumina ceramics and the phosphate bonds known to occur in cements (Odler, 2000). It has been reported that phosphorus can be incorporated into the network structure of geopolymers and that geopolymers give higher strength (MacKenzie, 2003), (MacKenzie et al., 2007). Table 3 shows the tensile strength of other bioceramics and bone compared to one of the results measured in this study.

Table 3. Comparison of tensile strengths of bone and some bio-ceramic materials (MacKenzie et al., 2010)

MATERIAL	TENSILE STRENGTH (MPa)	REFERENCE
Bone	60 – 160	(Heimann, 2002)
Cancellous Bone	3	(Thompson and Hench, 1998)
Hydroxyl Apatite	80	(Thompson and Hench, 1998)
Bioglass ®	42	(Thompson and Hench, 1998)
Bioglass ®	5.54 (SD 0.529)	(Bresciani et al., 2004) †
Bioglass ® / Polyethylene *	10.15	(Thompson and Hench, 1998)
Bioglass ® / Polysulfone *	1.5	(Thompson and Hench, 1998)
Apatite – Wollastonite Glass - Ceramic / Polyethylene *	14.87	(Thompson and Hench, 1998)
Ca-Phosphate Geopolymer (500°C)	4.04	†
Nano Al ₂ O ₃ Powder Geopolymer	3.10	†

†: Diametral compression testing

*: %40 ceramic, %60 polymeric phase

The direct comparison of the tensile strengths of the materials listed in Table 3 is not appropriate because of the non-constant parameters of the test methods. The result obtained from the unknown test method (Thompson and Hench, 1998) was much higher than the result obtained from the diameter compression test (Bresciani et al., 2004) (42 and 5.54 MPa, respectively).

All data obtained during mechanical experiments are the maximum load of the material. Tensile strength is calculated using the following formula:

$$\sigma = \frac{2P}{\pi Dt} \quad (1)$$

The applied load is P, D is diameter and t is the thickness of the sample. It is possible to determine the compressive strength by examining the relationship between compressive strength and tensile strength. Numerous empirical formulas have been proposed, many of which connect the following type of f_t (tensile stress) and f_c .

$f_t = k (f_c)^n$ (Ros and Shima, 2013), (Mohamed et al., 2016)

“k” and “n” are co-efficiency. “n” is between “1/2” and “3/4” are used (Mohamed et al., 2016). The old value was used by the American Concrete Institute, but Gardner and Poon later found another value, in both cases the cylinder was used. In general, the most appropriate expression is:

$f_t = 0.3 (f_c)^{2/3}$ (Gardner and Poon, 1976)

where “ f_t ” (splitting force) and “ f_c ” are both compressive strength of the cylinders as MPa. The graphs show the compressive strength of the empirical formula. According to the data obtained from the empirical formula given by the references, the graphical results were obtained by considering the compressive strength results and their relations with the tensile strength.

Table 4. Compression strength test results of 3, 7 and 28-day geopolymer samples

	NaOH		KOH		Al ₂ O ₃ Nanopowder GP (MPa)
	CaOH GP (MPa)	Ca ₃ (PO ₄) ₂ GP (MPa)	CaOH GP (MPa)	Ca ₃ (PO ₄) ₂ GP (MPa)	
3 days	14.03	11.42	10.96	10.10	10.03
7 days	46.45	36.09	30.61	30.56	37.16
28 days	56.29	42.19	46.67	38.49	39.40

4. Conclusions

The conclusion for the geopolymer samples examined;

- Geopolymerization was performed for both calcium contents and using the FTIR method proved geopolymeric structure. Using two alkali activators had positive results in terms of geopolymerization and the XRD analysis helped to identify the phase for the minerals in the metakaolin composition.

- High strength values were obtained especially in samples activated with sodium hydroxide and added calcium hydroxide compound.

- Although geopolymer samples containing alumina nanoparticles showed low strength values compared to calcium containing geopolymers, they were relatively close and showed good strength compared to literature values.

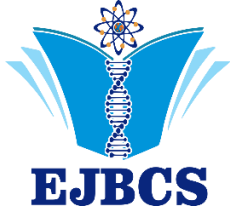
Acknowledgements

This project is supported by Yıldız Technical University Scientific Research Projects Coordination Unit and I would like to thank them for the support of FYL-2018-3468.

References

ASTM C109 2005. Standard test method of compressive strength of hydraulic cement mortars (using 2-in. or [50 mm] cube specimens). Annual Book of ASTM Standard, pp. 76–81.

- ASTM C191 2005. Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement by Vicat Needle. Annual Book of ASTM Standard, pp. 179–185.
- Barbosa V, MacKenzie K, Thaumaturgo C 2000. Synthesis and characterisation of Materials based on inorganic polymers of alumina and silica: Sodium polysialate polymer. *Int J Inorg Mater* 2:309–317.
- Bresciani E, Barata T, Fagundes TC, Adachi A, Terrin MM and Navarro MF 2004. Compressive and diametral tensile strength of glass ionomer cements. *J Appl Oral Sci* 4:344–348.
- Gardner NJ and Poon SM 1976. Time and Temperature Effects on Tensile, Bond, and Compressive Strengths. *ACI J. Proc* 73(7): 405–409 .
- Heimann RB 2002. Materials science of crystalline bioceramics: A review of basic properties and applications. *CMU J* 1(1):23–46.
- Korkusuz F, Tomin E, Yetkinler DN, Timuçin M, Öztürk A, Korkusuz P 2011. Yapay Kemik Dokusu. *TOTBİD Dergisi* 10(2):134–142.
- Lee WKW and Van Deventer JSJ 2002. The effects of inorganic salt contamination on the strength and durability of geopolymers. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 211(2):115–126 .
- MacKenzie KJD 2003. What are these things called Geopolymers. *Adv Cer Mat Comp IX Cer Trans* 153:175–186.
- MacKenzie KJD, Komphanchai S and Fletcher R A 2007. New Trends in the Chemistry of Inorganic Polymers for Advanced Applications. *Developments in Porous, Biological and Geopolymer Ceramics: Ceramic Engineering and Science Proceedings* 28(9):249–257.
- MacKenzie KJD, N Rahner, Smith ME, and Wong A 2010. Calcium-Containing Inorganic Polymers as Potential Bioactive Materials. *J Mater Sci*, 45(4):999–1007.
- Mohamed OA, Imam ZS, Najim O 2016. Splitting tensile strength of sustainable self-consolidating concrete. *Procedia Eng* 145:1218–1225.
- Odler I 2000. *Special Inorganic Cements*. E & FN Spon, London and New York.
- Oudadesse H, Derrien AC, Mami M, Martin S, Cathlineau G and Yahia L, 2007. Aluminosilicates and biphasic HA-TCP composites: studies of properties for bony filling. *Biomed Mater* 2:59–64.
- Ros S and Shima H 2013. Relationship between splitting tensile strength and compressive strength of concrete at early age with different types of cements and curing temperature histories. 13th Annual Convention of Japan Concrete Institute, *Concrete Institute Proceedings* 35:427–432 .
- Thompson ID and Hench LL 1998. Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites. *Proc Inst Mech Eng* 212(2):127–136.



Exopolysaccharide (EPS) production of halophilic bacteria

Hilal BAŞER^{1*}, Zehranur YÜKSEKDAĞ¹

¹Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD, Ankara, Türkiye

*Corresponding author : baserrhilal@gmail.com
Orcid No: https://orcid.org/0000-0002-3729-2372

Received : 26/07/2019
Accepted : 29/10/2019

Abstract: Exopolysaccharides (EPS), which are produced by halophilic bacteria and have protective properties against adverse environmental conditions, have wide application areas. In this study, EPS production of *Halomonas aquamarina* (NB2) and *Halobacillus trueperi* (NB7, NB8, NB9, NB10, NB11) strains in culture media was determined. EPS production of the strains was range from 15-55 mg/L. One strain with the highest EPS production capacity and the best development in the culture medium (NB7-47 mg/L) was selected and the influence of different concentrations of salt (5, 10, 15, 17.5, 20, 25, and 30%) and different carbon sources (sucrose, glucose, galactose, mannose) on EPS production was studied. When NB7 strain was grown in medium containing different concentrations of salt, the EPS production was changed (0-40 mg/L). The highest level of EPS production of the NB7 strain was observed in the medium with sucrose (488 mg/L) while the lowest level of EPS production of the NB7 strain was observed in the medium with galactose (144 mg/L). In this study, also, biofilm activities of these strains was determined. NB2, NB7, NB8, NB9 and NB10 strains were found to be strong biofilm producers and NB11 strains were intermediate biofilm producers. Finally, emulsification of lyophilized EPS (I-EPS) were designated. Emulsification activity of I-EPSs on hydrocarbons was found in the range of 3-26%. In the field of environment application of lyophilized EPS obtained from halophilic bacteria used in this study; it has the potential for use as an emulsifying agent.

Keywords: Halophilic bacteria, exopolysaccharide, emulsification, biofilm

Halofilik bakterilerde ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Özet: Halofilik bakteriler tarafından üretilen ve olumsuz çevre şartlarına karşı koruyucu özelliği olan ekzopolisakkaritler (EPS) geniş kullanım alanlarına sahiptirler. Bu çalışmada, halofilik bakterilerden *Halomonas aquamarina* (NB2) ve *Halobacillus trueperi* (NB7, NB8, NB9, NB10, NB11) suşlarının kültür ortamlarındaki EPS üretim yetenekleri belirlenmiştir. Suşların EPS üretimi miktarları 15-55 mg/L arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kültür ortamında en iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan halofilik bakteri suşu seçilerek (NB7-47 mg/L), farklı tuz konsantrasyonları (%5, %10, %15, %17,5, %20, %25 ve %30) ve farklı karbon kaynaklarının (sükroz, glikoz, galaktoz, mannoz) EPS üretimine etkisi tespit edilmiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarında NB7 suşunda EPS üretiminin konsantrasyon değişikliğine bağlı olarak değiştiği (0-40 mg/L) tespit edilmiştir. NB7 suşu, farklı karbon kaynaklarından, sükrozlu ortamda en yüksek (488 mg/L), galaktozlu ortamda ise en düşük (144 mg/L) EPS üretimi göstermiştir. Çalışmada ayrıca, bakterilerin biyofilm üretme yetenekleri belirlenmiştir. NB2, NB7, NB8, NB9 ve NB10 suşlarının güçlü biyofilm üreticisi, NB11 suşunun orta düzey biyofilm üreticisi olduğu bulunmuştur. Son olarak, bakterilerden izole edilen EPS'ler liyofilize edilerek, I-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesi belirlenmiştir. I-EPS'lerin kullanılan hidrokarbonları %3-26 arasında değişen oranlarda emülsifiye ettiği gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan halofilik bakterilerden elde edilen liyofilize EPS'lerin çevre uygulama alanında; emülsifiye ajan olarak kullanım potansiyeli olabilir.

Anahtar Kelimeler: Halofilik bakteri, ekzopolisakkarit, emülsifikasyon, biyofilm

1. Giriş

Halofilik mikroorganizmalar, hipersalin koşullarda yaşayabilen ve gelişmeleri için yüksek konsantrasyonlarda tuza (2-5 M NaCl) ihtiyaç duyan mikroorganizmalardır. Halofiller, Dünya'da aşırı tuzlu ortamlarda, çok yoğun tuzlu suların bulunduğu kurak bölgelerde, denizlerin derin bölgelerinde, denizden tuz elde etmek için oluşturulmuş yapay tuzlalarda ve salamura besinlerde bulunmaktadır

(Baltacı ve ark., 2017). Ekzopolisakkaritler (EPS), dallanmış veya tekrar eden birimlerde şekerler/şeker türevleri ve diğer karbonhidrat olmayan bileşenlerden oluşmaktadır (Sethi ve ark., 2019). Mikroorganizmalar genellikle yüksek bir hücresel yoğunluklu biyofilm ile bağlantılıdır ve stabilitesi polisakkarit zincirleri arasındaki etkileşimler yoluyla EPS'ler tarafından kontrol edilmektedir. Biyofilm oluşumuna, hücrelerin bir yüzeye yapışması, ardından çoğalması, mikrokolonilerin oluşumu

ve hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) üretimi ile başlanmaktadır. Hücreleri saran EPS matrisi esas olarak proteinlerden, polisakkaritlerden, lipitlerden ve nükleik asitlerden oluşmaktadır (Völkel ve ark., 2018). EPS'lerin bakteriyi olumsuz çevre şartlarından korunması ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlaması özelliklerinden yola çıkarak bilim insanları halofilik mikroorganizmaların, benzersiz EPS'lerin yeni biyoteknolojik işlemlerde değerli bir kaynak sağlayacağı yaygın olarak kabul edilmektedir (Gu ve ark., 2017; Yang ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019). Yüksek viskoziteli ve psödoplastik yapıya sahip halofilik EPS'ler, tuza toleranslı bir yüzey aktif madde görevi görebilir ve jelleştirici ajanlar, emülsifiye edici ajanlar ve metal bağlayıcılar olarak geniş kullanım alanına sahiptirler (Arias ve ark., 2003; Chikkanna ve ark., 2018).

Çevre sorunlarının artmasıyla birlikte aranan biyoteknolojik çözümler hayatımızın bir parçası olmaktadır. Dünyada birçok alanda tuz birikmesi nedeniyle aşırı tuzluluk göstermekte ve bu da alanları verimsiz hale getirebilmektedir. Aşırı tuzcul ortamlar birçok canlı için yaşamın mümkün olmadığı alanlardır. Bu nedenle bu salin alanlarda yaşayan halofilik mikroorganizmaların sahip oldukları özelliklerin ve yeteneklerin araştırılması önem taşımaktadır. Bu amaçla bu çalışmada, hipersalin ortamlardan izole edilen 6 halofilik bakterinin kültür ortamlarındaki EPS üretimlerinin belirlenmesi, iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip bir suşun seçilerek farklı tuz konsantrasyonlarının ve farklı karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisinin tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca, bakterilerin kültür ortamında biyofilm üretim kapasitesi ve liyofilize EPS'lerin (l-EPS) emülsifikasyonu belirlenerek emülsifiye ajanı olarak kullanılabilirliğinin açığa çıkartılması hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Araştırma, G. Ü. Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, Türkiye'nin çeşitli halofilik bölgelerinden izole edilen ve 16S rRNA bölgesine göre moleküler tanımlamaları yapılan *Halomonas* (1) ve *Halobacillus* (5) cinsine ait bakteriler ile yürütülmüştür. Bakterilerin geliştirilmesinde Medyum C Besiyeri (175 g NaCl; 20 g Mg.Cl₂.6H₂O; 5 g K₂SO₄; 0,1 g CaCl₂.2H₂O; 5 g yeast ekstrakt; 1 L distile su) kullanılmıştır.

2.1. Halofilik bakterilerin EPS üretimlerinin belirlenmesi ve EPS izolasyonu

Kültür ortamında EPS miktarını belirlemek ve izole etmek amacıyla Tsuda ve ark.,'nın (2008) metodu uygulanmış ve izole edilen EPS'ler liyofilize (l-EPS) edilmiştir. Liyofilize EPS'lerdeki EPS miktarlarını belirlemek için standart olarak glikoz kullanılarak fenol-sülfürik asit metodu (Dubois ve ark., 1956) ve protein içeriği, standart olarak BSA kullanılarak Bradford metodu (Bradford, 1976) ile belirlenmiştir.

2.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında ve karbon kaynaklarında EPS üretimlerinin belirlenmesi

Kültür ortamında en iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan halofilik bakteri suşu seçilmiş (NB7), Medyum C besiyerinde farklı tuz konsantrasyonları (%5, %10, %15, %17,5, %20, %25 ve %30) ve farklı karbon kaynakları (%1 sükröz, glikoz, galaktoz, mannoz) ilave edilerek EPS üretim miktarlarındaki değişimler Tsuda ve ark.,'nın (2008) metoduna göre tespit edilmiştir.

2.3. Halofilik bakterilerde biyofilm aktivitesi

6 halofilik bakterinin biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Liaqat ve ark., (2014) tarafından önerilen yöntem modifiye edilmiştir. Bakterilerin biyofilm üretim kapasiteleri Stepanovic ve ark., 2000; Vestby ve ark., 2009 tarafından verilen sınır değerlerinin dönüşümleriyle üretici değil, zayıf, orta düzey ve güçlü üretici olarak değerlendirilmiştir.

2.4. l-EPS' lerde emülsifikasyon aktivitesi

l-EPS' lerin emülsifikasyon aktiviteleri Cooper ve Goldenberg (1987) ile Patel ve Desai (1997) tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. Kontrol için Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100 kimyasal yüzey aktif maddeleri kullanılmıştır (Mata ve ark., 2006).

2.5. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizlerde SPSS 22.0 Evaluation programı kullanılmıştır. Pearson korelasyonuna göre, suşların EPS üretimi ile biyofilm aktivite, l-EPS ile emülsifikasyon aktivitesi arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir. ANOVA analizine göre, suşların EPS üretimi-farklı karbon kaynağı, EPS üretimi-farklı tuz konsantrasyonlarına göre farklılık olup olmadığı incelenmiştir.

3. Sonuçlar

3.1. Halofilik bakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Çalışmada kullanılan suşların kültür ortamındaki EPS üretim miktarları Tablo 1'de gösterilmiştir. EPS üretim kapasitesi yüksek olan suşlar *Halobacillus trueperi* NB11 (55±2 mg/L), NB7 (47±1 mg/L), NB10 (42±4 mg/L) iken, düşük EPS üreten suşlar *Halobacillus trueperi* NB9 (15±2 mg/L) ve NB8 (22±3 mg/L) olarak belirlenmiştir.

Çalışmada, halofilik bakterilerden izole edilen EPS'lerin liyofilizasyon sonrası EPS'lerdeki (l-EPS) EPS miktarları belirlenmiştir (Tablo 1). Sonuçlara göre, NB9 suşu hariç suşların kültür ortamında belirlenen EPS miktarı ile liyofilizasyon sonrası EPS miktarları paralellik göstermiştir ve tüm suşlarda liyofilizasyon sonrası EPS miktarının daha fazla olduğu dikkat çekmektedir.

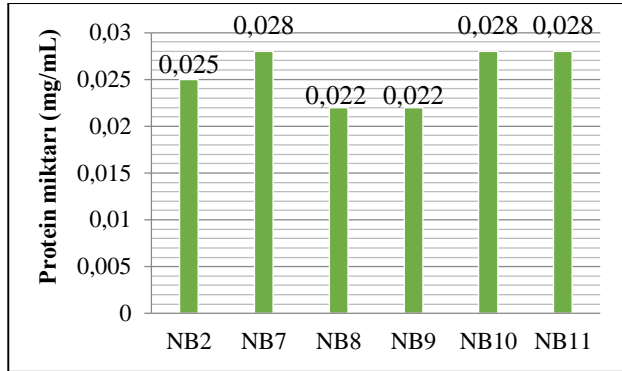
Tablo 1. Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında suşların EPS üretim miktarları.

Suşlar	EPS ¹ (mg/L)	EPS ² (mg/L)
<i>Halomonas aquamarina</i> NB2	33±1	449±1
<i>Halobacillus trueperi</i> NB7	47±1	798±1
<i>Halobacillus trueperi</i> NB8	22±3	448±2
<i>Halobacillus trueperi</i> NB9	15±2	684±7
<i>Halobacillus trueperi</i> NB10	42±4	841±6
<i>Halobacillus trueperi</i> NB11	55±2	647±3

1: Kültürlerin inkübasyon sonrası EPS üretim miktarı

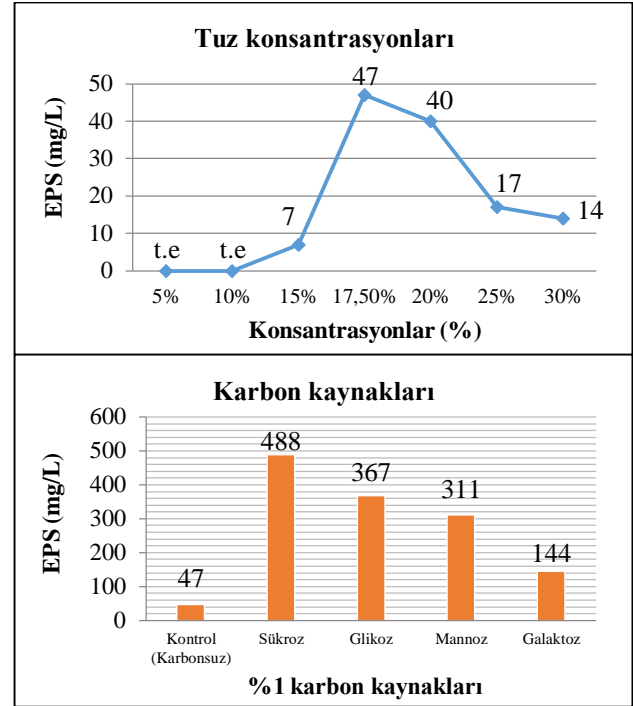
2: Saflaştırılmış ve liyofilize edilmiş toz halindeki EPS'deki toplam karbohidrat miktarı

Liyofilize edilmiş EPS'lerin protein miktarı sonuçları Şekil 1'de verilmiştir. Kültür ortamından saflaştırılıp liyofilizasyon sonrası elde edilen EPS'lerin (I-EPS) protein miktarı analizinde, en düşük protein miktarı NB8 ve NB9 (0,022 mg/mL) suşlarında, en yüksek protein miktarı NB7, NB10 ve NB11 (0,028 mg/mL) suşlarında bulunmuştur.

Şekil 1. I-EPS'lerin protein miktarları.

3.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında ve karbon kaynaklarında EPS üretiminin belirlenmesi

Elde edilen sonuçlara göre halofilik bakteriler arasında hem kültür ortamında EPS üretim miktarı hem de I-EPS miktarı diğer bakterilere göre daha iyi sonucu veren *H. trueperi* NB7 suşunun, farklı tuz konsantrasyonlarında ve farklı karbon kaynaklarında ürettiği EPS miktarları Şekil 2'de gösterilmiştir. NB7 suşunda %5 ve 10 tuz konsantrasyonlarında EPS üretimi tespit edilmezken en yüksek EPS üretimi %17,5'lük (kontrol) tuz konsantrasyonunda (47 mg/L) belirlenmiştir. NB7 suşu, farklı karbon kaynaklarından, sükrözlu ortamda en yüksek (488 mg/L), galaktozlu ortamda ise en düşük (144 mg/L) EPS üretimi göstermiş ve besiyerine karbon kaynağının eklenmesi EPS üretimini arttırmıştır.

Şekil 2. NB7 suşunun farklı tuz konsantrasyonlarında ve karbon kaynaklarında EPS üretim miktarları.

t.e: tespit edilmedi.

3.3. Halofilik Bakterilerin Biyofilm Üretim Karakteristikleri

Mikro plak yöntemi ile belirlenen halofilik bakterilerin biyofilm üretim karakteristikleri Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre NB2, NB7, NB8, NB9, NB10 suşları güçlü üretici, NB11 suşu ise orta düzey üretici olarak tespit edilmiştir.

Tablo 2. Halofilik bakterilerin biyofilm üretim karakteristikleri.

Suşlar	Sınır değeri (cut off)	Biyofilm üretim karakteristiği
NB2	2,212<2,548	Güçlü üretici
	2,096<2,539	
NB7	0,980<2,055	Güçlü üretici
	1,052<2,073	
NB8	1,764<2,251	Güçlü üretici
	1,776<2,254	
NB9	1,140<2,095	Güçlü üretici
	1,084<2,081	
NB10	1,788<2,257	Güçlü üretici
	1,708<2,234	
NB11	1,242<2,431≤2,484	Orta düzey üretici
	1,294<2,457≤2,588	

3.4. l-EPS' lerde emülsifikasyon aktivitelerinin belirlenmesi

Suşlardan izole edilen liyofilize EPS'lerin emülsifikasyon aktiviteleri zeytinyağı, mineral yağ, oktan, izopropil miristat, benzen, n-hekzan, toluen ve ksilol hidrokarbonları ile çalışılmıştır (Tablo 3). l-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesinde suşlardan izole edilen l-EPS'nin kullanılan hidrokarbonlar için emülsifiyer özelliklerinin değiştiği belirlenmiştir. l-EPS'lerin genel olarak *H. aquamarina* NB2 suşuna ait l-EPS hariç, en yüksek ksilol ve toluen

hidrokarbonlarını; izopropil miristat yağını ise tüm l-EPS'lerin emülsifiye ettiği görülmüştür. *H. trueperi* NB10 suşunun deneyde kullanılan tüm yağları ve hidrokarbonları emülsifiye ettiği görülmüştür. Suşlar arasında NB10 suşundan elde edilen l-EPS'nin ksilolu (%26), NB7 suşundan elde edilen l-EPS' nin tolueni (%23) en fazla emülsifiye ettiği belirlenmiştir. Kontrollerle karşılaştırıldığında l-EPS'lerin düşük emülsifiye özellikte olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3. l-EPS' lerin ve kontrollerin emülsifikasyon aktiviteleri.

Test edilen suşlar	Emülsifikasyon aktiviteleri (%E ₂₄)							
	Zeytin yağı	Mineral yağ	Oktan	İzopropil miristat	n-hekzan	Benzen	Ksilol	Toluen
NB2	3±0	-	5±2	3±0	-	-	-	-
NB7	-	3±0	14±0	8±2	3±0	10±0	17±0	23±0
NB8	6±0	-	3±0	9±0	11±1	8±0	22±0	11±0
NB9	3±0	3±0	5±2	9±0	-	14±0	8±2	8±1
NB10	13±2	9±0	10±0	8±2	6±0	19±1	26±2	15±2
NB11	9±0	3±0	-	8±2	-	5±2	6±0	13±0
Kontroller								
Tween 20	-	Homojen	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	Homojen	-	-	-	-
Triton X-100	71	74	74	77	74	45	91	86

--: sonuç vermedi.

4. Tartışma

Ekstremofilik organizmalardan elde edilen endüstriyel olarak önemli biyopolimerler yalnızca sağlam özelliklere sahip değil, aynı zamanda düşük maliyetlidirler (Chikkanna ve ark., 2018). Ekzopolisakkaritler bakteriler için koruyucu bariyer görevi yapmaktadırlar. EPS üretim miktarı birçok farklı örneğin ağır metal konsantrasyonu, tuz iyonları, pH derecesi, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu veya besiyeri bileşimi gibi koşullardan etkilenmektedir (Gupta ve Diwan, 2017; Kılıç ve Dönmez, 2019). Yapılan çalışmalarda, halofilik bakterilerde optimum tuz konsantrasyonlarında EPS üretiminin en yüksek olduğu bildirilmiştir. Optimum %7,5 tuz konsantrasyonunda *H. ventosae* ve *H. anticariensis* türlerine ait suşlarda 28 – 49 g/L arasında EPS üretimi (Mata ve ark., 2006), *H. almeriensis* M8T suşunda 1,7 g/L EPS üretimi (Llamas ve ark., 2012), optimum %10 tuz konsantrasyonunda *Chromohalobacter canadensis* 28 suşunda 58 µg/mL EPS üretimi (Radchenkova ve ark., 2018) ve optimum %5 tuz konsantrasyonunda *H. nitroreducens* WB1 suşunda 125 mg/mL EPS üretimi (Chikkanna ve ark., 2018) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, EPS üretim miktarları *Halomonas aquamarina* NB2 suşunda 33 mg/L ve *Halobacillus trueperi* (NB7, NB8, NB9, NB10, NB11) suşlarında 15-55 mg/L arasında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, halofilik bakterilerin EPS üretim miktarının aynı tür içerisinde suşlara göre değiştiğini göstermektedir. *H. trueperi* NB7 suşu, %5 ve %10 tuz konsantrasyonunda gelişme

göstermediği için, bakteri bu tuz konsantrasyonlarında EPS üretimi göstermemiştir.

Mikrobiyolojik çalışmalarda mikroorganizmaların büyümesini ve EPS üretimlerini etkileyen en önemli faktörlerden birisi de kullanılan karbon kaynağıdır (Nour El-Dein ve ark., 2004). Ekzopolisakkarit üretiminde en çok kullanılan karbon kaynakları sükröz ve glikozdur. Yapılan çalışmalarda, *H. almeriensis* M8T suşunda (1,7 g/L) glikozlu ortamda (Llamas ve ark., 2012), *Halomonas* sp. AAD6 suşunun (1,0726 g/L) sükrözlu ortamda (Kazak, 2009), *Chromohalobacter canadensis* 28 suşunun (130 µg/mL) laktozlu ortamda (Radchenkova ve ark., 2018) en yüksek EPS üretimine sahip oldukları bildirilmiştir. Bu çalışmada, *H. trueperi* NB7 suşunun en yüksek sükrözlu ortamda (448 mg/L) EPS ürettiği tespit edilmiştir. Besi ortamı kompozisyonu EPS üretiminde önemli rolü olduğundan, tüm karbon kaynaklarında EPS üretimini oldukça artırması bir avantaj olarak görülmüştür. İstatistiksel olarak, kullanılan karbon kaynakları- tuz konsantrasyonları ve EPS üretimi arasında p=0,00<0,05 düzeyinde anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada, suşların kültür ortamında belirlenen EPS miktarı ile liyofilizasyon sonrası EPS (l-EPS) miktarları belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimine sahip *Halobacillus trueperi* NB10 suşundan elde edilen l-EPS'nin miktarı 841±6 mg/L; en düşük EPS üretimine sahip *Halobacillus trueperi* NB8 suşundan elde edilen l-EPS'nin miktarı 448±2

mg/L olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar liyofilizasyon öncesi ve sonrasında, NB9 suşu hariç, paralellilik göstermiş olup, liyofilizasyon sonrası EPS miktarının çok daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun nedeni olarak, liyofilizasyonda yüksek hacimde kültürlerin kullanılması ve yüksek hacimde EPS'nin kısmi olarak saflaştırılarak elde edilmiş olmasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

EPS'lerin esas organik fraksiyonları karbonhidratlar ve proteinlerdir (Nouha ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda, halofilik *Salipiger mucosus* A3T suşuna ait EPS'nin % 1,6 (w/w) (Llamas ve ark., 2010), *Halomonas* sp. AAD6 suşuna ait EPS'nin %0,5125 (Kazak, 2009), *H. almeriensis* suşuna ait EPS'de %1,1 (w/w) (Llamas ve ark., 2012) protein içeriğine sahip oldukları bildirilmiştir. Bu çalışmada, kültür ortamından saflaştırılıp liyofilizasyon sonrası elde edilen EPS'lerin (I-EPS) protein miktar analizinde, en düşük protein miktarı NB8 ve NB9 (0,022 mg/mL) suşlarında, en yüksek protein miktarı NB7, NB10 ve NB11 (0,028 mg/mL) suşlarında bulunmuştur. Literatürlere göre çalışmada kullanılan bakterilerin düşük protein içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel olarak, I-EPS miktarı ile protein miktarı ($p=0,618$) arasında orta düzey pozitif yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Mikrobiyal biyofilmlerin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin (Sarikaya ve ark., 2017) yanı sıra yer altı su kaynaklarının kontaminasyonun engellenmesi, kullanılmayan ve çevreye zararlı olabilecek petrol yataklarının çevrenmesi ve maden yataklarından çevreye yayılan sülfür ve benzeri yan ürünlerin detoksifikasyonu şeklinde olumlu etkileri de gösterilmiştir (Ünal, 2011). Bu çalışmada, tüm suşların biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu her ne kadar sağlık için tehdit oluştursa da özellikle hipersalin ortamlar için biyofilm üreticisi olan suşların kontaminasyon önleyici ve endüstriyel atıkları uzaklaştırma gibi çevre uygulamalarında olumlu yönleri bulunmaktadır. Ancak biyofilmin etkisi hakkında daha detaylı çalışılması gerekmektedir. Biyofilm kapasitesini belirlerken ekzopolisakkarit miktarı esas alındığından, EPS üretimi ile biyofilm üretimi arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir (Coenye ve Nelis, 2010). Bu çalışmada, EPS üretimi ile biyofilm aktivitesi arasında orta düzey pozitif yönde ($p=0,515$) bir korelasyon bulunmuştur.

EPS'ler, farklı yağ ve su karışımlarını verimli bir şekilde stabilize eder. Hidrofobik fazlar bitkisel yağ, mineral yağ veya bir hidrokarbondur. Endüstriyel işlemlerde, emülgatörler aşırı sıcaklık, çevre, pH ve tuzluluk değerlerine maruz kalabilir (Freitas ve ark., 2009). Proteinler, bazı EPS'lerin emülsifiye edici kapasitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Mata ve ark., 2006; Llamas ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda, halofilik bakterilere ait suşlarda emülsifikasyon aktivitelerinin %35,5 ila %85 arasında değişen oranlarda olduğu bildirilmiştir (Mata ve ark., 2006; Chikkanna ve ark., 2018). Bu çalışmada, literatürlerle karşılaştırıldığında daha düşük emülsiyonlaştırıcı etki görülmüştür. Bunun nedeni, I-EPS içerisindeki protein miktarının düşük olmasından kaynaklı olabilir. İstatistiksel olarak, I-EPS ile emülsifikasyon

aktivitesi arasında zayıf düzeyde anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

5. Sonuç

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ile *H. aquamarina* (NB2) ve *H. trueperi* (NB7, NB8, NB9, NB10, NB11) suşlarının ekzopolisakkarit üretim yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. *H. trueperi* NB7 suşunun optimum tuz konsantrasyonu ve karbon kaynağı belirlenerek, ekzopolisakkarit üretim yeteneğinin artırılması biyoteknolojik uygulamalarda bir avantaj olarak görülmüştür. Ekzopolisakkarit üretim yeteneğine sahip suşların biyofilm üreticisi olduğu ve I-EPS'lerin emülsiyon yapıcı olarak uygulamalarda kullanılabilir özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Halofilik bakterilerin ürettiği I-EPS'lerin verimini ortalama 20 kat artırarak yükseltmesi, protein açısından düşük olması ve farklı hidrokarbonlarda emülsifikasyon aktivite göstermesi nedeniyle birçok alanda emülgatör olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür. Ekstrem şartlarda gelişme gösteren halofilik bakteriler ile çalışmak zaman alıcı ve maliyetlidir. Ancak hipersalin ortamlar için potansiyel uygulamalara sahiptir. Bu çalışmada kullanılan halofilik bakterilerin, elde edilen EPS'lerin (özellikle I-EPS'lerinin) ilk kez çalışılmış olması, çevre için geri kazanımda ve biyoteknolojik potansiyel uygulamalarda kullanılabilir olabileceğini düşündürmüştür. Daha net sonuçlar elde edilebilmesi için daha fazla çalışma yapılarak desteklenmesi gerekmektedir.

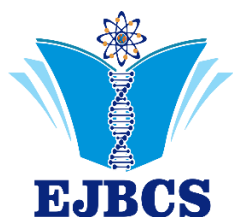
Teşekkür

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2018-04 kodu ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Arias S, del Moral A, Ferrer MR, Tallon R, Quesada E, Bejar V 2003. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* 7: 319-326.
- Baltacı N, Yüksekdağ ZN, Aslım B 2017. Biodegradation of petroleum hydrocarbon pollutants by Halophilic bacteria and archaea strains. *Fresen Environ Bull* 26(1): 686-694.
- Bradford M 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Chikkanna A, Ghosh D, Kishore A 2018. Expression and characterization of a potential exopolysaccharide from a newly isolated halophilic thermotolerant bacteria *Halomonas nitroreducens* strain WB1. *PeerJ* 6(e4684): 1-18.
- Coenye T, Nelis HJ 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Meth* 83(2): 89-105.
- Cooper DG, Goldenberg BG 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 53(2): 224-229.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28(3): 350-356.
- Freitas F, Alves VD, Carvalheira M, Costa N, Oliveira R, Reis MAM 2009. Emulsifying behaviour and rheological properties

- of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol by product. *Carbohydr Polym* 78(3): 549–556.
- Gu D, Jiao Y, Wu J, Liu Z, Chen Q 2017. Optimization of EPS production and characterization by a Halophilic Bacterium, *Kocuria rosea* ZJUQH from Chaka Salt Lake with response surface methodology. *Molecules* 22: 814.
- Gupta P, Diwan B 2017. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol Rep* 13: 58-71.
- Kazak H 2009. Exopolysaccharide production by *Halomonas* strains isolated from Turkey. Thesis For The Degree of Master of Science in Bioengineering, Marmara University, Institute for graduate studies in pure and applied sciences, İstanbul 1-54.
- Kılıç NK, Dönmez G 2019. Farklı ortam koşullarının *Micrococcus* sp. ekzopolisakkarit üretimine etkisi. *AKÜ FEMÜBİD* 19: 40-46.
- Liaqat I, Bachmann RT, Edyvean RGJ 2014. Type 2 Quorum sensing monitoring, inhibition and biofilm formation in marine microorganisms. *Curr Microbiol* 68: 342-351.
- Llamas I, Amjres H, Mata JA, Quesada E, Bejar V 2012. The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules* 17: 7103–7120.
- Llamas I, Mata JA, Tallon R, Bressollier P, Urdaci MC, Quesada E, Bejar V 2010. Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3T, a halophilic species belonging to the Alphaproteobacteria, isolated on the Spanish Mediterranean Seaboard. *Mar Drugs* 8: 2240-2251.
- Mata JA, Bejar V, Llamas I, Arias S, Bressollier P, Tallon R, Urdaci MC, Quesada E 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res Microbiol* 157: 827-835.
- Nouha K, Hoang NY, Yan Song, Tyagi RD, Surampalli RY 2015. Characterization of Extracellular Polymeric Substances (Eps) Produced by *Cloacibacterium normanense* Isolated from Wastewater Sludge for Sludge Settling and Dewatering. *J Civil Environ Eng*, 5:6.
- Nour El-Dein MM, El-Fallal AM, El-Shahat Toson A, Hereher EF 2004. Exopolysaccharides production by *Pleurotus pulmonarius*: Factors affecting formation and their structures. *Pak J Biol Sci* 7(6): 1078-1084.
- Patel RM, Desai AJ 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett Appl Microbiol* 25: 91-94.
- Radchenkova N, Boyadzhieva I, Atanasova N, Poli A, Finore I, Di Donato P, Nicolaus B, Panchev I, Kuncheva M, Kambourova M 2018. Extracellular polymer substance synthesized by a halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 4937-4949.
- Sarikaya H, Belma A, Yüksekdağ Z 2017. Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (l-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *Int Food Prop* 20: 362–371.
- Sethi D, Mohanty S, Pattanayak SK 2019. Effect of different carbon, nitrogen and vitamin sources on exopolysaccharide production of *Rhizobium* species isolated from root nodule of redgram. *Indian J Biochem Biophysics* 56: 86-93.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Meth* 40(2): 175-9.
- Tsuda H, Hara K, Miyamoto T 2008. Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *J Dairy Sci* 91: 2960-2966.
- Ünal D 2011. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* ve *Candida* cinsi mikroorganizmalarda biyofilm varlığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1-298.
- Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. *BMC Veterinary Res* 5: 20.
- Völkel S, Fröls S, Pfeifer F 2018. Heavy metal ion stress on *Halobacterium salinarum* R1 planktonic cells and biofilms. *Front Microbiol* 9: 3157, 1-14.
- Wang J, Salem DR, Sani RK 2019. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydr Polym* 205: 8-26.
- Yang Y, Shao Z, Du J, He Q, Chai H 2018. Enhancement of organic matter removal in an integrated biofilm-membrane bioreactor treating high-salinity wastewater. *Archaea Vol* 2018: 8.



Practical Notes for Quantification of Antibiotics Resistant Bacteria and Antibiotics Resistance Genes in Wastewater

Shadman Tariq Sadiq^{1*}, Saif Talib Jasim², Aymen A. AL-Bayati³, Salar Hassanzadeh¹, Asiye Esra Eren¹,
Gülhan Tunç¹

¹Department of Industrial and Fundamental Microbiology, Ege university, Izmir 35040, Turkey.

²General Directorate of Education in Anbar, Ministry of Education, ALQaim, Anbar, Iraq.

³Department of Biotechnology, Cukurova university, Adana, Turkey.

*Corresponding author : shadmantsm@tu.edu.iq
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-5920-4513>

Received : 16/06/2019
Accepted : 05/10/2019

Abstract: The occurrence of new chemical and microbiological contaminants in the aquatic environment has become an issue of increasing environmental concern. Integrated antibiotic resistance surveillance is one of the objectives of the World Health Organization global action plan on antimicrobial resistance. Urban wastewater treatment plants (UWWTPs) are among the most important receptors and as a spot of antibiotic – Bacteria interaction. Thus, wastewater treatment plants (WWTPs) play an important part in the dissemination of so-called new emerging pathogens and antibiotic resistances. So, the periodical survey of antibiotic resistance genes in WWTP and finding new techniques consider the best step to reducing this emergence problem.

Key words; Antibiotics resistance, Wastewater, resistance bacteria

© EJBCS. All rights reserved.

1.Introduction

Waste water treatment plants (WWTPs) and Wastewater (WW) play as big reservoirs for both antibiotic resistance bacteria (ARB) and antibiotics residues (AR). and due to incomplete metabolism of antibiotics in humans or by disposal of unused antibiotics this WWTPs will be a disseminating spots for ARB & AR (Bouki C et al. 2013). Since Waste water contains a complex combination of different chemical material like disinfectants, antibiotics and heavy metals which can trigger antibiotics resistance by selection pressure, even in low concentrations. Also can increase the chance of antibiotics resistance because WWTP consider interaction area for Antibiotics and Bacteria from Different Sources (Karkman A et al . 2018). Every day municipality WWTPs receive wastes that full of bacteria and antimicrobial agents from various sources, making it ideal environment microbes to interact and exchange genes horizontally with different microbial species (Berendonk T.U et al. 2015; Martínez J.L. 2009; Pal C et al. 2016)

Recent reports estimates that, by 2050, 10 million people will die every year due to antibiotics resistance unless a global societies response to this problem (Kraker M.E.A et al. 2016). Because of this problem expanding day after day

(Shadman T.S &Yasa I. 2018). it must be there periodical research and development for assessment of ARB & ARG from waste water and apply new practical methods to enhance the quantification and identification of these pollutants.

Therefore, according to our experienceses in this field we highlights some practical nots to be taked in considerations by other researchers whene they starting this kinde researches.

2.ARB & ARGs quantification methods

For the past 70 years, research in antibiotic resistance has focused mainly on pathogens. Isolating microbial pure cultures still the most important method in microbiology. In the other side antibiotic susceptibility testing of bacteria is relatively inexpensive and gives important data on resistance patterns that are needed for the clinical treatment of patients (Karkman A et al. 2018). Most scientific reports showed that ARGs identification studies have focused on the use of real-time PCR (polymerase chain reaction) or real-time quantitative PCR (Q-PCR).

Now days (Q-PCR) amplification is widely applied for determining ARG within environmental samples without

the need for culturing especially in WWTPs (Zhu Y G et al. 2013; Yuan Q et al. 2016; Turolla M et al. 2018).

Culturing based methods give us the number of total bacterial cells but cannot give us real quantity of resistance

In the following we will put some notes in researchers hand to be followed when start to work on ARB & ARGs:-

- 1- Study of UWWTP Samples separately from industrial or hospital WWTPs.
- 2- Starting with the most commonly used antibiotics in specific geographic of sampling site to make a survey about the amount of antibiotics eliminated to the environment.
- 3- Some antibiotics used profusely in winter like erythromycin and some used plenty in other seasons, so must be taken in consideration, this mean that ARG & ARB can be changed according seasons. for examples ARG in *salmonella typhi* and *Vibrio cholera* bacteria can be rare in winter.
- 4- Collecting water samples in dark glass bottles are better than plastic bottles to avoid any degradations by light or interactions with plastics.
- 5- Do not collect samples in rainy weather to avoid interacting with water coming from other source out of WWTP canals.
- 6- Transport samples by ice containers and process within 2- 4 hour.
- 7- Water samples must be concentrated firstly by filtration through nitrocellulose membranes filters (pore size 0.45 mm) and the filters were rinsed with saline to provide optimum filtration.
- 8- Using R2A agar medium is better than Luria-Bertani Medium (LB) medium for total bacterial counting and must be immediatly performed after filtration, Max 6h.
- 9- Filtrate can be store in (- 80 °C) for DNA extractions in coming days.
- 10- Antibiotics resistance increased with presence of antibiotics residues,pesticides and heavy metals. So, antibiotics resistance genes survey also need analyses of these materials.

bacteria and ARG, for this reason the best method is using PCR technique.

- 11- Some antibiotics are sensitive for degradation and unstable, like ampicilline and tetracycline, so its recommended to take precautions in the time of sample processe.

References

- Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, Buergermann H, Sorum H, Norstrom M, Pons M N, Kreuzinger N, Huovinen P, Stefani S, Schwartz T, Kisand V, Baquero F, Luis Martinez J 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* 13 (5), 310e317
- Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E 2013. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants. *Ecotox and Environ Safety*, 91, 1-9.
- Karkman A, Do T.T, Walsh F, Virta M. P 2018. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, 26(3), 220-228.
- Martínez JL 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157, 2893–2902.
- Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson D.G 2016. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome*, 4 (1).
- Kraker MEA, Stewardson A.J, Harbarth 2016. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050. *PLoS Med* 13(11): e1002184.
- Shadman TS, Yasa I 2018. Viability study of some antibiotic resistance bacteria percentage isolated from wastewater effluent samples in Manisa / Turkey. 2018; *World J Pharm Res* 7(16).
- Turolla M, Cattaneo F, Marazzi V, Mezzanotte M, Antonelli 2018. Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading. *Chemosphere J*, 191, 761-769.
- Yuan Q, Guo M, Wei W, Yang J 2016. Reductions of bacterial antibiotic resistance through five biological treatment processes treated municipal wastewater. *Environmental Science Pollution Researchs*, 23(19), 19495-19503.
- Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Hashsham SA, Tiedje JM 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese wine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110, 3435–3440.



EJBCS