



EJBCS

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

Cilt: 3 Volume: 2 Year: 2020

e-ISSN 2651-5237



EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Cilt: 3 Volume: 2 Year: 2020

Published Biannually

Corresponding Address

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

E-mail: mtdogan1@gmail.com

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

Editor in Chief

Prof. Dr. Muhittin DOĞAN

Editor (Associate)

Assist. Prof. Dr. Muhammet DOĞAN

Editorial Board

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ	Hatay Mustafa Kemal University, Turkey
Prof. Dr. Anna PEKSA	Wrocław University, Poland
Prof. Dr. Elif LOLOĞLU	Gazi University, Turkey
Prof. Dr. Elif ÖZTETİK	Eskisehir Technical University, Turkey
Prof. Dr. Erol ATAY	Hatay Mustafa Kemal University, Turkey
Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL	İnönü University, Turkey
Prof. Dr. Issa SHARİFPOUR	Iranian Fisheries Research Organization, Iran
Prof. Dr. İsmet YILMAZ	İnönü University, Turkey
Prof. Dr. Osman GÜLNAZ	Cukurova University, Turkey
Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR	Adnan Menderes University, Turkey
Prof. Dr. Vladimer TSITSISHVILI	Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia
Prof. Dr. Zeliha SELAMOĞLU	Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. Gökhan NUR	Gaziantep University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. H. Ahmet DEVECİ	Gaziantep University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. Şenay UĞUR	Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey
Assoc. Prof. Dr. Utku AVCI	Recep Tayyip Erdoğan University, Turkey
Assist. Prof. Dr. Mustafa PEHLİVAN	Gaziantep University, Turkey
Dr. Ardalan PASDARAN	Shiraz University, Iran.
Dr. Eva URGEOVÁ	The University of St. Cyril and Methodius of Trnava, Slovakia

Language Editor

Assist. Prof. Dr. Demet DOĞAN Gaziantep University, Turkey

Technical Editor

Assoc. Prof. Dr. Mustafa SEVİNDİK Osmaniye Korkut Ata University, Turkey

Owner / Publisher

Muhammet DOĞAN

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

All responsibility of the articles belongs to the authors.

e-ISSN 2651-5237



EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Cilt: 3 Volume: 2 Year: 2020

Contents / İçindekiler

Research Articles / Araştırma Makeleleri

- A study on the skull of the striped hyaena (*Hyaena hyaena*: Hyaenidae, Carnivora) 78-82**
Erol ATAY, Mahmut TATLI, İsmail ÇETİN
- Biyobozunur plastiğin mineralizasyonuna evsel arıtma çamurunun etkisi 83-92**
Nurgül UZUNBOY, Cafer TÜRKMEN
- Rutin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antioksidan Aktivitesinin Değerlendirilmesi 93-99**
Özlem ARAÇ, Gizem BEYOĞLU, Derya TAŞKIN, Pelin PELİT ARAYICI, Kadriye KIZILBEY, Serap DERMAN
- Production of indole-3acetic acid (IAA) using *Erwinia herbicola* with vitreoscilla hemoglobin gene transferred 100-105**
Aslı GİRAY, Hikmet GEÇKİL
- Multiple shoot induction and plant regeneration of *Staurogyne repens* (Nees) Kuntze ... 106-109**
Merve Şifa Hane KÖSE, Muhammet DOĞAN, Gökhan SADI
- Morphological, anatomical and ecological studies on *Orchis simia* (Orchidaceae) taxon of Eskişehir, Turkey 110-115**
Derviş ÖZTÜRK
- A Validated HPLC-UV Method for Determination of Dopamine HCl in Injectable Solutions 116-120**
Beyza Sultan AYDIN, İbrahim BULDUK
- Biberiye Ekstresi ve Kaolin İçeren Polivinil Alkol/Nişasta Aktif Kompozit Filmler: Yapısal, Mekanik ve Antioksidan Aktivite Özellikleri 121-129**
Eslem KAVAS, Pınar TERZİOĞLU, Meltem TAŞ, Fatma Nur PARIN, Çiğdem KUŞ, Selçuk KÜÇÜKAYDIN, Mehmet Emin DURU
- Farklı Besi Ortamlarında Yetişen *Chlorella Vulgaris* Türüne Ait Protein Ve Aminoasit Kompozisyonunun Karşılaştırılması..... 130-137**
Merve KAVASBASIOGLU, İlhami TUZUN, Yaşar ALUÇ
- Endemic fishes in transboundary river basins in Turkey 138-142**
Ozlem ABLAK GURBUZ
- Increased antibacterial activity of plant oils against foodborne pathogens through their encapsulation into chitosan based nanoparticles..... 143-147**
Azime YILMAZ, Meyrem VEHAPİ

Yaşlı sıçanlarda skopolamin kullanımının karaciğer dokuları üzerine morfolojik ve ultrayapısal etkilerinin değerlendirilmesi 148-153

Bükay YENİCE GÜRSU, Elif AKSÖZ, Büşra ASLAN, Betül YILMAZ ÖZTÜRK, İlknur DAĞ

Fitozom formülasyonundan berberin miktar tayini için HPLC yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonu 154-159

Ayça GÜNGÖR-AK, Ayşegül KARATAŞ

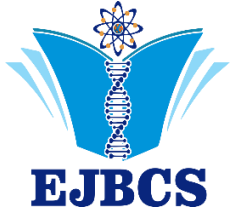
Review Articles / Derleme Makaleler

Availability by evaluating rainwater of irrigation and fogging systems in herbal production in greenhouse conditions 160-164

Murat ÖZOCAK

Kedilerde Piretroid Toksikasyonu 165-168

Rahmi CANBAR, Enver YAZAR



A study on the skull of the striped hyaena (*Hyaena hyaena*: Hyaenidae, Carnivora)

Erol Atay^{1*}, Mahmut Tatlı², İsmail Turan Çetin²

¹Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Mustafa Kemal University, Hatay, TURKEY

²Institute of Science, Mustafa Kemal University, Hatay, TURKEY

*Corresponding author : eatay@mku.edu.tr

Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-5274-1025>

Received : 27/04/2020

Accepted : 15/09/2020

Abstrac: Striped hyena one of the rapidly declining carnivore in Turkey (near threatened worldwide). Field studies have been carried out since 2013 in order to determine the current status and ecology striped hyena in Hatay and Şanlıurfa provinces. During our field surveys, four skulls and mandibulae of striped hyena were found. The muscles and skin parts were cleaned in the laboratory, skulls were kept in 1% sodium hypochlorite solution for 24 hours and then washed with water. Examination and measurements were made on the skulls and photographs were taken. Fascial length, Cranial length, Skull width, Cranial width, Skull base and Palatal length measurements of skulls; total length, total height, candular height and length of dental series on the mandible were respectively measured. The anatomical structures of skulls was photographed from the top, bottom and sides. Because of lack of information about the anatomical measurements and structure of the skull of the striped hyena, this study was needed. Additionally, factors impacting the population of striped hyena in Hatay and Şanlıurfa countryside are briefly given. If we look at the purpose of this study after, the detailed information gathered, now calls for prioritization of detailed studies on the skull that have not been conducted so far. The ecology of the striped hyena also needs to be studied in Turkey. The study is also an effort to intive the attention of the researchers to focus on the research regarding the rapidly deterioraing population of the striped hyena and determining the current status.

Keywords: Striped Hyaena; *Hyaena hyaena*; Hyaenidae; Carnivora

Çizgili sırtlan (*Hyaena hyaena*: Hyaenidae, Carnivora) kafatası üzerine bir çalışma

Özet: Türkiye’de sayıları hızla azalan carnivorlardan biri olan çizgili sırtlanların Hatay ve Şanlıurfa illerindeki mevcut durumunu ve ekolojisini belirlemek amacıyla 2013 yılından beri arazi çalışmaları yapılmaktadır. Arazi çalışmaları süresince toplam dört tane çizgili sırtlana ait kafatasları ve alt çeneleri bulunmuştur. Laboratuvarında kas ve deri parçaları temizlenen kafatasları %1’lik sodium hypochlorite çözeltisinde yaklaşık 24 saat bekletildikten sonra su ile yıkanmıştır. Kafataslarının üzerinde incelemeler ve ölçümler yapılarak fotoğrafları çekilmiştir. Kafataslarının sırasıyla Fascial length, Cranial length, Skull width, Cranial width, Skull base, Skull width ve Palatal length ölçümleri; mandible üzerinde de Total length, Total height, Candular height ve Length of the dental series ölçümleri yapılmıştır. Kafataslarının üstten, alttan ve yandan fotoğrafları çekilerek anatomik yapıları fotoğraf üzerinde gösterildi. Çizgili sırtlana ait kafatasının anatomik ölçümleri ve yapısı hakkında bilgi eksikliği olduğu için bu çalışmaya ihtiyaç duyulmuştur. Çalışmaya ek olarak, Hatay ve Şanlıurfa kırsalındaki çizgili sırtlanlara yönelik en büyük tehdit unsurları kısaca verilmiştir. Çizgili sırtlan hakkında verilen ayrıntılı bilgilerden sonra bu çalışmanın amacına bakarsak, şu ana kadar incelenmemiş olan kafatasına öncelik vermektir. Buna ek olarak, Türkiye’de sayıları hızla azalan çizgili sırtlanların Türkiye’deki araştırmacıların dikkatini bu canlılara çekmektir.

Anahtar Kelimeler: Striped Hyaena; *Hyaena hyaena*; Hyaenidae; Carnivora.

1. Introduction

Being a large set of carnivores, the hyena family is represented by only four species on earth (*Hyaena hyaena*, *Parahyaena brunnea*, *Crocuta crocuta*, *Proteles cristata*) (Mills and Hofer 1998; Koepfli et al. 2006; Yıldırım 2010; Sheng et al. 2014; Atay et al. 2017). Regarding their general characteristics, striped hyenas have similar natural

distributions; they prefer steppes, semi-deserts, rocky fields and valleys with sparse trees (Mills and Hoffer 1998). They avoid deserts, high altitude areas, dense bushes and forests. Striped hyena prefers living inside caves (Mills and Hoffer 1998; Yıldırım 2010; Atay et al. 2017). Just like the rest of the world, these animals strive for survival with humans in their co-habitation. These animals also contribute to the health of ecosystem by eating dead and decaying animal

carcasses (Mills and Hofer 1998; Bunaian et al. 2001; Singh, 2008; Stein et al., 2013). Dietary preferences of the species include spined (Bon et al. 2012) and non-spined animals, various fruits, vegetables and human-sourced organic wastes (Wagner, 2006). Being a dietary opportunist, hyenas are omnivore carcass eaters. When starved, they can feed on melons, watermelons, grapes and some other vegetables (Mills and Hoffer 1998; Yıldırım 2010).

Striped hyena lives in rocky mountains and valleys located in semi-deserts, steppes, bushes and crooked pine forests of Turkey (Yıldırım 2010). Striped hyaena is a carnivore with dog-like posture (Abi-Said, 2004). The back is inclined to the tail with vertical black stripes on sides of the body. Overall body colour is pale-gray or beige. There are 5 - 9 prominent vertical stripes on the body, vertical and horizontal light-black stripes on front and hind legs. Body mass is around 26-41 kg in males and 26-34 kg in females (Mills and Hofer 1998; Yıldırım 2010; Atay et al. 2017). The striped hyena gives birth one to four (average three) offspring after approximately 90 days of pregnancy (Wagner 2006). The offspring begins feeding on meat after 30 days. They are reported to be fed on mother's milk until they are four to five months old. In Turkey, striped hyenas mate in January and February. They give birth in April and May and females are mature for mating when they are almost two - three years old (Mills and Hofer 1998; Wagner 2006; Yıldırım 2010; Atay et al. 2017).

The species is distributed over North and Middle Africa, Anatolia, Arabian Peninsula, Middle East, Caucassia, Middle Asia and India (Rieger 1981; Mills and Hofer 1998; Bunaian et al. 2001; Wagner 2006; Yıldırım 2010). Kumerlovee (1982) reported the first information on the presence of striped hyenas in Central, East, West and South-East Anatolia. Kasperek et al. (2004) indicated that the striped hyena has a non-uniform distribution in Turkey and has been recorded in Çanakkale, İzmir, Antalya, Hatay and South-East Anatolia (Şanlıurfa) of Turkey in the last 25 years. According to their distribution over a wide range of areas, regional adaptations and morphological changes, striped hyaena is represented by the following species; *Hyaena hyaena barbara* (Northwest Africa), *Hyaena h. dubbah* (Northeast Africa), *Hyaena h. sultana* (Arabian Peninsula), *Hyaena h. syriaca* (Syria, Anatolia and Caucassia), *Hyaena h. hyaena* (India) (Rieger 1981; Mills and Hofer 1998; Qarqaz et al. 2004; Singh 2008; Yıldırım 2010; Atay et al. 2017).

The International Union for the Conservation of Nature (IUCN) has classified the striped hyena as Near Threatened (Abidsaid and Dloniak. 2015). Despite the important role of the striped hyena in ecosystems, little effort has been devoted in studying them. Habitat changes across their range seem a possible cause of declining populations (Ripple et al. 2014). Evaluation of the population status and their habitat features at the local and regional level is essential for planning a conservation plan for viable populations. Monitoring these animals in their habitats appears to be a better strategy for such conservation approaches. Only a few studies have looked into the ecology of striped hyena (Singh 2008; Yıldırım 2010; Atay et al. 2017).

Because of the lack of information on the anatomical measurements and structure of the skull of the striped hyena, this study was undertaken.

If we look at the purpose of this study after the detailed information given about the striped hyena, it should give priority to the skull that has not been study so far. Another purpose is to provide the ecology of the striped hyena in Turkey. In addition, the striped hyena is declining rapidly in Turkey, by the work we would like to take attention of the researchers to these creatures.

2. Materials and Method

Field studies have been carried out since 2013 in order to determine the current status and ecology of Hatay and Şanlıurfa provinces. Field studies were conducted in Antakya, Altınözü, Kırıkhan and Yayladağı districts in Hatay province; Birecik and Halfeti districts in Şanlıurfa province.

In this study, backpack, 5 camera traps (Bushnell), Canon EOS 70D digital camera, laptop (Hp), digital caliper, Olympus sterio microscope, petri dishes and pliers of various sizes were used.

Four striped hyena skulls were found in field studies. The skulls were brought to the laboratory with the mandibles. The extraneous material such as soil and mud on the skulls was washed with water and then left in 1% sodium hypochlorite solution for 24 hours. Then, the remains of soft tissues such as skin and muscles on the skull were cleaned with scalpel and forceps. After washing the skulls with plenty of water, skulls were allowed to dry. Fallen or swinging teeth on the maxilla and mandibula of the skull were fixed in place.

Measurements were taken on the skulls and mandibula using digital callipers to determine anatomical structures. The measurements made on the skull are given in Table 1. Fascial length, cranial length, skull width, cranial width, skull base and palatal length measurements of skulls; total length, total height, candular height and length of dental series were measured on the mandible. The anatomical structure of skulls were photographed from the top, bottom and sides. The anatomical structure were shown in the image.

3. Results and Discussion

Four striped hyena skulls were found during field surveys in Antakya, Altınözü, Kırıkhan and Yayladağı districts of Hatay province and Birecik and Halfeti districts of Şanlıurfa province. One female killed in a car crash in the Küncülü Strait near Enek village of Antakya district of Hatay province in 2014, two skulls were found in the area near the Syrian border in 2015 and 2016. The fourth skull was found in the rocky area near Sucu village of Kırıkhan district near the Syrian border in 2019.

Anatomic measurements are given in Table 1. As the skulls worn out under field conditions, some teeth were missing from maxilla and mandible. Six incisors, two canines, four premolars and two molars teeth on Maxilla, and six incisors, two canines, three premolars and two molars on the mandible were still present.

Dorsal and ventral views of skull showing craniometric points; bones of the skull, dorsal and ventral aspects, cranial sutures, dorsal and ventral aspects; skull and mandible anatomy; maxilla and mandible teeth series were exhibited in this research (Figures 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

Four skulls were gathered off dead animals from 2014 to 2019. One female was killed in 2014 in a road accident, another shot as traced by hunting dog in 2015, the third found dead in a village near Syrian border in 2016, and the fourth was found in the rocky area near Sucu village near the Syrian border in 2019, killed by a pack of shepherd dogs as was apparent from numerous lethal deep tooth marks found on its throat. Killing of two striped hyena by shepherd dogs was in March 2019 in a rocky area at a location near the Syrian border and another from Adıyaman countryside in April 2019 (Figure 11 A, B, C, D). Such events represent the greatest threat to the striped hyena generation.

In Şanlıurfa (Birecik and Halfeti), striped hyena generally prefers caves around semi desert fields and sparsely vegetated fields with rocky and steep surroundings. There are eight actively used caves. Although the definite number is not certain, 20 individuals are thought to be living in this region. An image of a mother and baby striped hyena obtained near the Syrian border of the Kırıkhan district of Hatay. (Figure 12).

Table 1. The anatomical measurements of the mandibles and skulls of the Striped Hyaena.

Morphometric Parameters	Sample 1 (Female)	Sample 2 (Sex unkn)	Sample 3 (Sex unkn)	Sample 4 (Sex unkn)	Average (mm)
Skull Base	189	168	178	183	178
Skull Width	160	122	149	154	146
Palotal Length	114	99	105	111	107
Fascial Length	73	63	68	70	69
Cranial Length	160	133	148	153	149
Cranial Width	62	56	58	59	59
Total Length (TL)	172	148	168	165	163
Total Height (TH)	86	75	80	82	81
Candular Height (CH)	55	44	50	53	51
Length of the Dental Series (LDS)	105	95	100	102	111

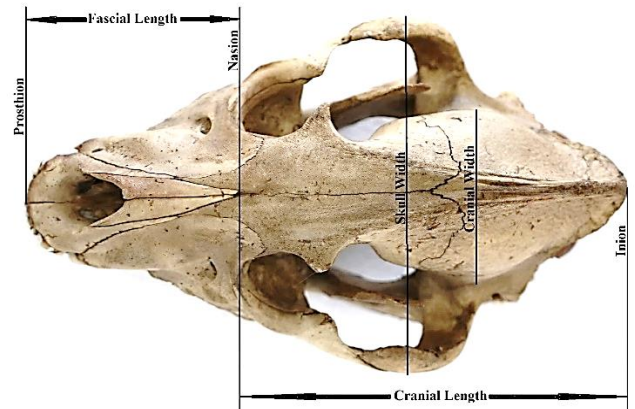


Figure 1. Skull, dorsal view showing craniometric points.

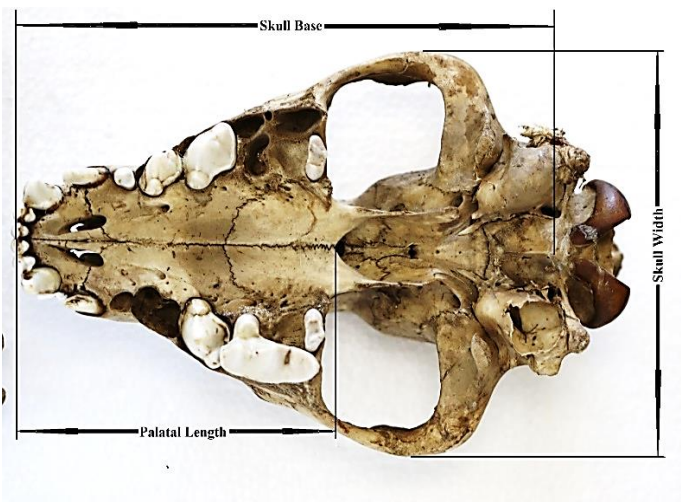


Figure 2. Skull, ventral view showing craniometric points.

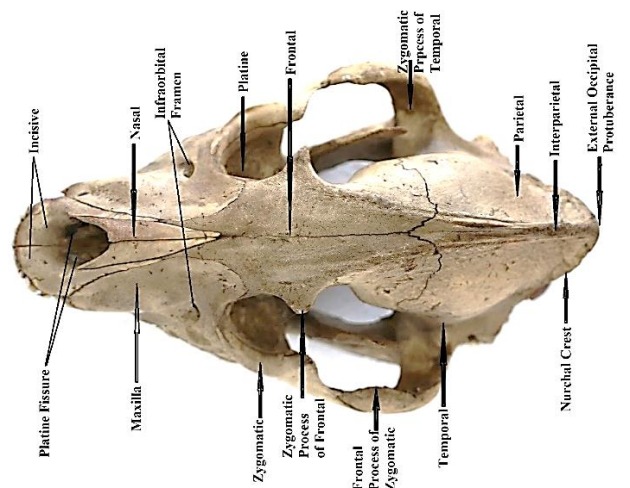


Figure 3. Bones of the skull, dorsal aspect.

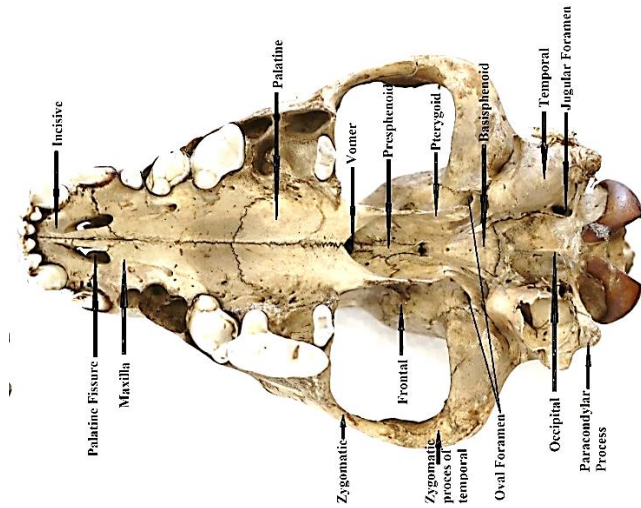


Figure 4. Bones of the skull, ventral aspect.

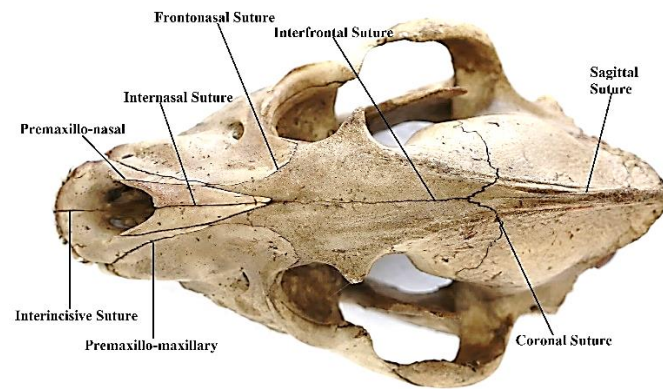


Figure 5. Cranial sutures, dorsal view.

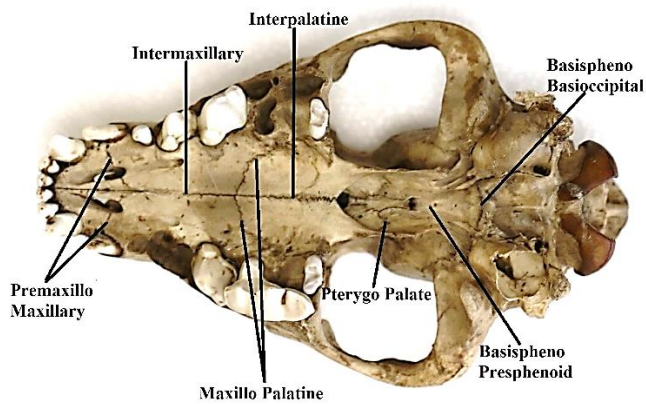


Figure 6. Cranial sutures, ventral view.

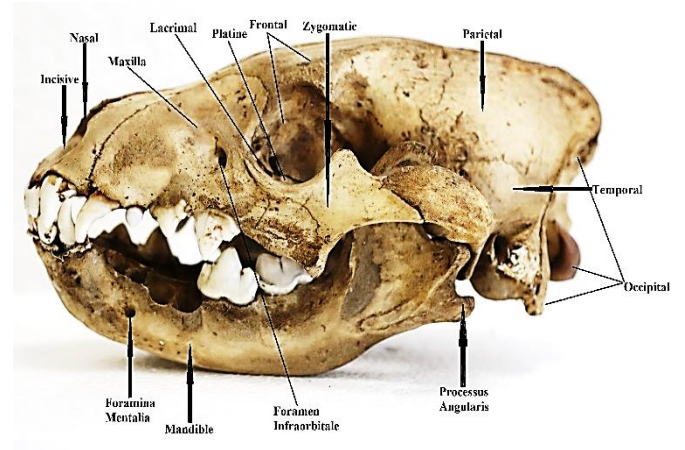


Figure 7. The Striped Hyena skull anatomy, lateral aspect.



Figure 8. Mandible of the Striped Hyena (mandible lateral view: total length = TL, total height = TH, candular height = CH and length of the dental series = LDS).

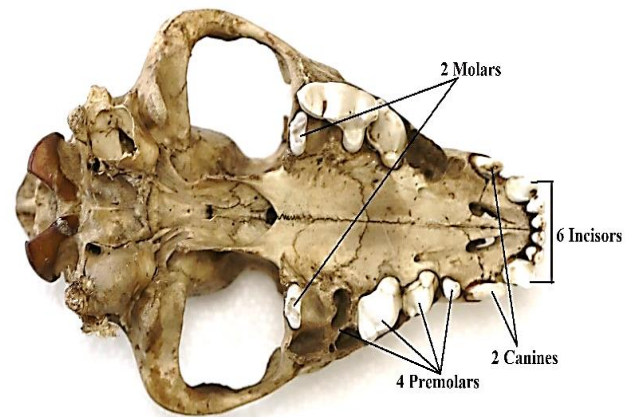


Figure 9. The maxilla teeth series of the Striped Hyena

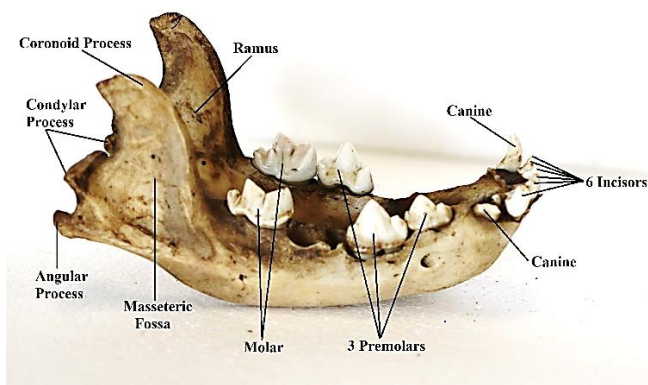


Figure 10. The mandible teeth series of the Striped Hyaena.



Figure 11. A. Female hyena killed hitting a vehicle in Enek Village in Hatay (2014), B. A hyena killed in a vehicle crash on the Gaziantep-Şanlıurfa Highway (January 2017), C. A hyena killed by shepherd dogs, Kırıkhan District of Hatay (April 2019), D. A striped hyena shredded by shepherd dogs in the Adiyaman countryside (2019).



Figure 12. A female and her baby in the Syrian province of Hatay. (Nisan 2019).

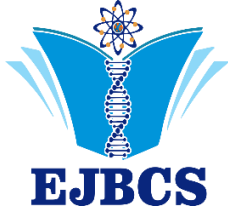
Acknowledgement

Thanks are due to Nuri Akın (Nature Protection and National Parks Antakya Branch) and İsmet Ceyhun Yıldırım.

References

- Abi-Said MR 2004. Breeding potential of the striped hyaena, *Hyaena hyaena syriaca* Matschie, 1910 (Carnivora) in captivity. *Zo Mid Ea.* 33:79-86.
- Abidsaid M, Dloniak SMD 2015. *Hyaena hyaena*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015:e.T10274A45195080. <https://dx.doi.org/10.2305>
- Atay E, Kasapoğlu A, Çetin İT 2017. Status of the Striped Hyena (*Hyaena hyaena*) in Hatay and Şanlıurfa-Turkey. *TURJAF* 5(10):1165-1179.

- Bunaian F, Hatough A, Ababaneh D, Mashaqbeh S, Yousefand M, Amr Z 2001. The Carnivores of the Northeastern Badia, Jordan. *Turk J Zo.* 25:19-25.
- Kasperek M, Kasperek A, Gözcelioğlu B, Çolak E, Yiğit N 2004. On the status and distribution of the Striped Hyena, *Hyaena hyaena*, in Turkey. *Zo Mid Ea.* 33:93-108.
- Koepfli KL, Jenks SM, Eizirik E, Zahirpour T, Valkenburgh BV, Wayne RK 2006. Molecular systematics of the Hyaenidae: Relationships of a relictual lineage resolved by a molecular supermatrix. *Mol Phy Evo.* 38:603-620.
- Kumerloeve H 1982. Historical development of research and findings on *Anatolian mammals*. *İst Uni For Fac J.* 32:265-273.
- Mills MGL, Hofer H 1998. Hyenas. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Hyena Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Qarqaz AM, Abu Baker A, Amr ZS 2004. Status and ecology of the Striped Hyena, in Jordan. *Zo Mid Ea* 33:87-92.
- Rieger I 1981. *Hyaena hyaena*. *Mam Sp* 150: 1-5.
- Ripple WJ, Estes JA, Beschta RL, Wilmers CC, Ritchie EG, Hebblewhite M, Berger J, Elmhagen B, Letnic M, Nelson MP, Schmitz OJ, Smith DW, Wallach AD, Wirsing AJ 2014. Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science* 343:61-67.
- Sheng G, Soubrier J, Liu J, Werdelin L, Llamas B, Thomson BA, Tuke JH, Wu LJ, Hou XD, Chen QJ, Lai X., Cooper A 2014. Pleistocene Chinese cave hyenas and the recent Eurasian history of the spotted hyena, *Crocuta crocuta*. *Mol Ec.* 23:522-533.
- Singh P 2008. Population density and feeding ecology of the striped hyaena (*Hyaena hyaena*) in relation to land use patterns in an arid region of Rajasthan. A Thesis Submitted to The Manipal University Master of Science.
- Stein AB, Fuller TK, Marker LL 2013. Brown Hyena Feeding Ecology on Namibian Farmlands. *South Afr J Wild Res.* 43:27-32.
- Wagner AP 2006. Behavioral ecology of the striped Hyena (*Hyaena hyaena*). Montana State University Bozeman, Montana.
- Yıldırım İC 2010. Hatay yöresinde çizgili sırtlan (*Hyaena hyaena* L.) ekolojisi üzerine araştırmalar. Kırıkhan Sütçü İmam Üniversitesi, F B Enst. Orman Müh. Kahramanmaraş, Türkiye.



The effect of sewage sludge of mineralization on biodegradable plastic

Nurgül Uzunboy¹ , Cafer Türkmen^{1*} 

¹Çanakkale Onsekiz Mart University, Agricultural Faculty, Department of soil Science and Plant Nutrition, Çanakkale, Turkey
Phone: 0 286 2180018/1316

*Corresponding author: turkmen@comu.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-0707-5908>

Received : 29/04/2020
Accepted : 01/12/2020

Abstract: This study aimed to determine the effects of municipal sewage sludge (MSS) on degradation of a polylactic acid-based biodegradable plastic material in soil environment. Five different doses of MSS were used as of allowed quantity by Solid Waste Control Regulations, half of this quantity, double of this quantity and 1:1 MSS:Soil mixture. A control without MSS was also used. These doses were applied to soils together with biodegradable plastic plates. Samples were taken in 15-day intervals throughout 4 months of incubation. Samples were weighed with an ultra precise scale to get weight loss in biodegradable plastic plates. Ammonium (NH₄⁺) and nitrate (NO₃⁻) contents, number of microorganisms and urease and catalase enzyme activity of the soil samples were also determined. Present findings revealed that mass loss of biodegradable plastic plates varied significantly with sampling time and MSS doses (p≤0.01). In the last sampling time, the greatest mass loss of biodegradable plastic plates was observed in 1:1 MSS:Soil treatment. While the interaction effects of sampling time and MSS doses on number of microorganisms were not found to be significant, separate effects of these parameters were found to be significant (p≤0.05). Number of microorganisms increased with increasing MSS doses. The interactive effects of MSS and incubation time on NH₄ and NO₃, urease and catalase enzyme activities were found to be significant (p<0.05). NH₄, NO₃, urease and catalase activity increased with increasing MSS doses and decreased with increasing incubation times. Present findings revealed that MSS and biodegradable plastics could be stored together. Such a process can be applied in regular solid waste repositories until the recovery (recycle) problems of the bioplastics are resolved. Further research is recommended to be conducted in municipal waste repositories under different organic waste conditions.

Keywords: Polylactic acid, bioplastic, sewage sludge, soil, biodegradation

Biyobozunur plastiğin mineralizasyonuna evsel arıtma çamurunun etkisi

Özet: Bu çalışma; Polilaktik asit bazlı biyobozunur bir plastik materyalin toprak ortamında bozunum sürecine kentsel arıtma çamurunun etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada; Arıtma çamurunun katı atıkların kontrolü yönetmeliğince izin verilen miktarı, bu miktarın yarısı ve iki katı, 1:1 oranı (%50 toprak:%50 arıtma çamuru) ile arıtma çamuru uygulanmayan (kontrol) dozu olmak üzere beş doz belirlenmiş ve biyobozunur plastik levhalarla birlikte toprağa uygulanmıştır. Dört aylık inkübasyonun 15'er günlük periyotlarında örneklemeler yapılarak biyobozunur plastik levhalardaki kütle kayıpları belirlenmiş, alınan toprak örneklerinde amonyum (NH₄⁺) ve nitrat (NO₃⁻), mikroorganizma sayıları, üreaz ve katalaz enzimi analizleri yapılmıştır.

Elde edilen verilere göre biyobozunur plastik levhalardaki kütle kaybı örneklem zamanına ve çamur dozlarına göre önemli miktarlarda değişmiştir (p≤0.01). Son örneklem zamanındaki "1:1" arıtma çamuru uygulanan biyobozunur plastik levhalardaki kütle kaybı en fazla olmuştur. Topraktaki mikroorganizma sayıları üzerine örneklem zamanı ile arıtma çamuru dozlarının birlikte etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmazken, faktörlerin bağımsız etkileri önemli bulunmuştur (p≤0.05). Arıtma çamurunun miktarı arttıkça mikroorganizma sayılarında artışlar gözlemlenmiştir. Toprak örneklerinde incelenen NH₄⁺ ve NO₃⁻ miktarları ile üreaz ve katalaz enzim aktivitelerine uygulanan arıtma çamuru ve inkübasyon zamanının birlikte etkisi önemli olmuştur (p<0.05). Uygulanan çamur dozları arttıkça NH₄⁺, NO₃⁻, üreaz ve katalaz enzim aktivitelerinde artış görülürken, inkübasyon zamanı ilerledikçe incelenen özelliklerin tümünde azalma görülmüştür. Bu inkübasyon çalışmasından elde edilen sonuçlara göre evsel atıksu arıtma çamurları ile biyobozunur plastikler birlikte depolanabilir. Bu işlem biyoplastiklerin geri kazanım sorunlarının giderimine kadar kentlerde düzenli katı atık deponi alanlarında uygulanabilir. Bu tür araştırmalar çeşitli organik atıklarla arazi şartlarındaki düzenli deponi alanlarında yapılmalı ve yaygınlaştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Polilaktik asit, biyoplastik, arıtma çamuru, toprak, biyobozunma

1. Giriş

Son yüzyılda endüstri devrimine ek olarak insanların nüfus artışı ve refahlarını yükseltme arzuları doğal çevre üzerindeki baskıları artırmıştır. Bu durum özellikle tarımsal, endüstriyel ve kentsel atıkları çevre kirliliği sorunu boyutlarına ulaştırmıştır (Topbaş ve ark. 1998). Bu kapsamda arıtma çamurları ve plastik ambalaj atıkları başlıca artan kentsel atıklardan olmuş; benzer durum yüzyılın son çeyreğinde polilaktik asit gibi doğal materyallerden elde edilen “biyoplastikler” için de geçerli olmuştur. Günümüze gelindiğinde plastiklerin içinde “biyoparçalanabilir” plastiklerin kullanım ve tüketimleri gün geçtikçe daha çok kullanılarak artmaktadır.

Plastikler doğal gaz, petrol ve kömür gibi karbon kaynaklarından elde edilmektedir. Plastik malzemeler üretimlerinden tüketimlerine kadar süreçte pek çok avantajlı özelliklerinden dolayı kullanımı oldukça yaygın olan malzemelerdir. Plastiklerin kolay şekil alması, hafifliği nedeniyle depolama ve taşımada sağladığı avantajlar; otomotiv endüstrisinden tıbbi malzemelere kadar her sektörde kullanılmalarını sağlamış ve modern yaşamın bir parçası haline getirmiştir (El-Kadi 2010).

Plastiklerin keşfinden bugüne plastik üretimi ve dolayısıyla tüketimi giderek hızla artmaktadır. Dünyada 2018 yılında üretilen toplam plastik miktarı 359 milyon ton iken Avrupa’da 2018 yılında üretilen toplam plastik miktarı 61.8 milyon ton olarak belirlenmiştir. (Anonim 2019a). Plastikler hemen kullanılıp atılabildiklerinden, üretimlerinden kısa bir süre sonra katı atık sorununa neden olmakta ve doğada çok uzun süre boyunca bozunmadan kalmaktadır. Bu sebeple bu atıkların yönetimi büyük öneme sahip olmakta ve özellikle geri dönüşüm ve yeniden kullanımlarının yeterli oranda yapılamaması dolayısıyla da kentsel deponi alanlarına gönderilen plastikler büyük çevre sorunlarına sebep olmaktadır (Wu 2009). Plastiklerin geniş uygulama alanlarında kullanılması ve tüketimlerinin bu kadar fazla olması sebebiyle, dünyanın her yerinde büyük miktarlarda plastik atık meydana gelmektedir (Aguado ve Serrano 1999; Sarasa ve ark. 2008). Plastiklerin parçalanmaya karşı dayanıklı olmaları çöp deponi alanlarına bertarafı yönünden sakıncalar oluşturmaktadır (Sarasa ve ark. 2008).

Bu nedenle, son yıllarda biyolojik olarak parçalanma özelliğindeki polimerlerin üretimi önem kazanmış ve petrol türevi polimerlerin yerini almalarına yönelik araştırmalar artmıştır (Page 1992; Beyatlı 1996; Ma ve ark. 2009).

Yenilenebilir yani biyolojik kökenli polimerlerden elde edilen plastikler “biyoplastikler” olarak tanımlanmıştır. Biyoplastiklerin biyoparçalanabilirliği ASTM (2003) tarafından “Materyalin artık görsel olarak ayırt edilemeyecek boyutlara kadar parçalandığı, toksik atık bırakmadığı, diğer bilinen organik maddeler ile CO₂, su, inorganik bileşikler ve biyokütle kaybı oluşturarak kompostlanması esasına dayalı biyolojik proseslerle bir plastiğin parçalanması” olarak tanımlar.

Biyoplastikler başta bitkisel hammaddelerden elde edilmektedir. Biyoplastikler ayrıca hayvansal ürünlerden,

mantarlardan, alg veya bakteriler gibi canlı organizmalardan da üretilen biyolojik materyallerdir (Luengo ve ark. 2003; Rajendran ve ark. 2012; Reddy ve ark. 2012). Biyoplastiklerin geleneksel plastiklerden üstün özellikleri; kolay bozunmaları, petrole olan bağımlılığı azaltmaları, toksik etkilerinin olmaması, kolay geri dönüşümleri, daha düşük enerjiyle üretimleri ve ekolojik olmaları şeklinde özetlenebilir (Luengo ve ark. 2003; Davis ve Song 2006; Köksal ve ark. 2019). Yenilenebilir kaynaklı biyoplastikler genellikle mısır, patates, arpa, buğday, pirinç, manyok ve sorgum gibi bitkilerden elde edilen nişasta bazlı polimerler olarak sayılmaktadır (Lörcks 1998; Momani 2009; Cheng-Cheng 2011).

Günümüzde gıda endüstrisinde paketleme uygulamalarında kullanılan biyoplastiklerin yüzde olarak en büyük kısmını nişasta bazlı biyoplastikler meydana getirmektedir (Gonzalez-Gutierrez ve ark. 2010). Özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa’da oldukça geniş pazar payına sahip olan biyoplastikler diş fırçası, tarak, tükenmez kalem ve kredi kartları gibi kişisel eşyalar, ekme torbaları, süt şişeleri gibi ambalajlar dâhil, tekstil ürünlerinden, tutkal ve sıvalara kadar birçok alanda kullanılmaktadır (Stevens 2002; El-Kadi 2010).

Bu nişasta kaynaklı biyopolimerlere örnek olarak biyobozunurluğu yüksek olan polilaktik asit (PLA) örnek verilebilir. Mısır, patates ve şeker gibi nişasta formlarından elde edilen PLA biyoplastiklerinin, toprakta bakteriyel ataklar sonucunda ve enzimatik ortamlarda sadece birkaç haftada ayrışabildiği bilinmektedir (Wu 2009). Özellikle biyopolimerler grubunda yer alan PLA’in bozunma süreçlerindeki farklı süreçler bu polimerlerin kullanım alanlarını da çoğaltmıştır. Bu durum yüzyılın son çeyreğinde (PLA) bazlı doğal plastik materyallerden elde edilen biyoplastiklerin oranını artırmada önemli bir gerekçe olmuştur (Stevens 2002; El-Kadi 2010).

Dünya nüfus artışına paralel olarak kentlerde yaşayan nüfus ve dolayısıyla da atıksu miktarları da hızlı bir şekilde artmıştır. Buna bağlı olarak kentlerdeki atıksu arıtma tesislerinin sayıları da hızla artmıştır. Bu tesislerde askıda katı maddelerin giderimi sonucu ortaya çıkan ağırlıkça % 0,25 ile % 12 katı madde içeren atıklar, arıtma çamuru olarak isimlendirilmektedir (Filibeli 1996; Gaspard ve ark. 1997; Bilgin 1997). Arıtma çamurları, kısmen suyu uzaklaştırılmış, organik madde bakımından zengin geleneksel atık su arıtma tesislerinin mutlak bir son ürünü olarak tanımlanmaktadır (Bruce ve Davis 1988).

Atık suların içerisinde bulunan patojenlerin, ağır metallerin, organik kirleticilerin, çeşitli toksik maddelerin ve kirletilmiş suyun doğayı kirletmesini önlemek için atıksuları uzaklaştırmadan önce arıtılması gerekmektedir. Bu nedenle atıksuların arıtılması sonucu açığa çıkan arıtma çamurları katı atıklar içerisinde önemli bir yere sahiptir. Atıksuların arıtma işlemleri sonucu kuru madde bazında ülkemizde 2018 yılında 319 bin ton atık çamur oluştuğu tespit edilmiştir (Anonim 2019b).

Arıtma çamur miktarlarının ülkemizdeki artışları, çamur stabilizasyon yöntemlerini ve çamurların değişik alanlarda yeniden değerlendirilmesi konularını gündeme getirmiştir

(Arcak ve ark. 2000; Aydın 2004). Arıtma çamurları T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı katı atıkların kontrolü yönetmeliği (Anonim 2010) kapsamındaki tehlikeli atık sınıfında değerlendirildiği durumlarda, ilgili belediyeler düzenli çöp deponi alanlarına arıtma çamurlarının dökülmesini istememektedirler. Özellikle büyük şehirlerde fazla miktarlarda arıtma çamurları ortaya çıkmakta bu miktarlardaki arıtma çamurlarını yerel yönetimler ne yapacaklarını bilememektedir. Bu kapsamda çamur bertarafında değişik alternatiflere yönelimler olmaktadır. Bunlardan birkaçı; kurularak fabrikalarda yakıt olarak tüketme, tarım alanlarında toprak düzenleyici olarak kullanma, organik gübre kaynağı olarak yönetmeliklerin izin verdiği sınırlı miktarlarda kullanma, peyzaj alanlarında organik gübre olarak kullanma gibi uygulamalar sayılabilir.

Tüm bu yöntemlere rağmen binlerce ton arıtma çamurunun doğada nerede ne şekilde bertaraf edileceği konusu sıkça gündeme gelmektedir. Avrupa Birliği'nde başlıca bertaraf yöntemlerinin uygulanma oranları içerisinde ilk sırayı tarım alanlarında kullanım, ikinci sırayı yakma, üçüncü sırayı ise düzenli depolama almaktadır (Anonim 2012). Bu yöntemler arasında en kolay, en ucuz ve en az çevre riski olan, arıtma çamurlarının diğer atıklarla birlikte düzenli depolama alanlarına gömülmesi alternatifidir.

Kısaca oluşan biyoplastik atıkların ve arıtma çamurlarının bertarafındaki zorluklar ve topraklarda birikimleri bu materyallerin birlikte biyolojik olarak parçalanma potansiyellerinin araştırılması gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmada; katı atıklar sınıfındaki biyobozunur plastik atıklar ve arıtma çamurlarının birlikte depolanması durumunda biyobozunur plastik materyalin bozunma sürecine arıtma çamurunun etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Deneme materyalleri

Denemede Çanakkale Belediyesi ileri biyolojik atıksu arıtma tesisinden elde edilen arıtma çamurları ve ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dardanos Yerleşkesi'ndeki deneme parsellerinden alınan toprak örnekleri kullanılmıştır. Alınan örnekler gölgede kurutulup tahta tokmakla ezilerek 2 mm gözenek çaplı elekten geçirildikten sonra kullanılmıştır.

Biyobozunur plastik materyal ise; Nature Works LLC firmasından (USA) temin edilen standart PLA bazlı polimer toplar (Ingeo™ Biopolymer 4043D) üzerine analitik saflıkta 78.4 g PLA için 2.03 mL tetrahidrofur (THF) eklenerek 60 °C'de manyetik balık eşliğinde eritilmiş, daha sonra temiz petri kaplarına eşit miktarda (12,7 mL) dökülerek steril kabin (laminar flow cabinet) içerisinde toz, mikroorganizma ve güneş etkisinde kalmayacak şekilde katılaşmaya bırakılarak elde edilmiştir. Homojen kabul edilen bu biyobozunur plastik materyallerden 2.5 cm çaplı dairesel levhalar kesilerek denemede kullanılmıştır.

2.2. Deneme materyallerinin temel özellikleri ve toplam ağır metal kapsamları

Araştırmada materyal olarak kullanılan toprak ve arıtma çamurunun temel özellikleri ve ağır metal analizleri

verilmiştir. Deneme toprağı hafif alkali reaksiyon göstermektedir, organik madde içeriği "az" sınıfında olup, toprak tuzsuz, tınlı bünyeli ve orta derecede kireç içermektedir.

Arıtma çamurunda ise; organik madde, toplam azot, toplam fosfor ve toplam potasyum deneme toprağından zengin olup araştırmada materyallerinin analiz değerleri tabloda görülmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Araştırma materyallerinin temel özellikleri

Özellik	Toprak		Arıtma Çamuru	
Org. Madde (%)	1.81		42.73	
pH	8.01		6.39	
EC (dS m ⁻¹)	0.42		1.46	
CaCO ₃ (%)	11.86		-----	
Bünye	Tın (%51 Kum, %35 Mil, %14 Kil)		-----	
Solma Noktası nemi (%)	4.21		9.65	
Tarla Kapasitesi nemi (%)	21.98		48.66	
Metaller	Alınabilir (mg kg ⁻¹)		Toplam (mg kg ⁻¹)	
	Toprak	Çamur	Toprak	Çamur
Cu	1.59	1.01	8.96	46.33
Cr	0.01	0.08	37.93	32.35
Pb	0.03	5.91	11.00	16.21
Ni	1.00	5.25	49.55	24.41
Cd	0.03	0.12	0.23	0.621
Zn	1.20	364.67	42.44	729.34

Arıtma çamurlarında Zn, Cu, Pb ve Cd en çok kaygı duyulan ve çevre kirleticisi metallere aittir. Çinko, Cu ve Pb fitotoksik etkilere sahip olmalarından, Cd'un ise besin zincirine yüksek oranda girmesinden ve biyoakümülyasyon oranının yüksekliği nedeniyle önem arz etmektedir (Udom ve ark. 2004).

2.3. Deneme materyallerinin analiz yöntemleri

Denemede materyallerinden arıtma çamuru, toprak ve PLA levhalarda yapılan analizler ve bu analizler için seçilen yöntemler ve cihazlar şöyledir:

Toprak organik maddesi Jackson (1958), arıtma çamurunda organik madde DIN EN ISO 1172 (1998), toprakta ve arıtma çamurunda nem miktarları gravimetrik olarak Allmaras ve Gardner (1956), toprakta ve arıtma çamurunda pH-EC (1:2.5w/w toprak-1:5w/w arıtma çamuru) Richards (1954), toprakta ve arıtma çamurunda toplam ağır metaller HNO₃ ve HCl asitler karıştırılarak (3:1) elde edilen kral suyu (aqua regia) asit karışımında yaş yakılan (Berrow ve Stein 1983) örneklerde Perkin Elmer Optima 8000, ICP-OES cihazı yardımı ile belirlenmiştir. Toprak ve çamurda tarla kapasiteleri Klute (1986)'ya göre belirlenmiş, toprak bünyesi Bouyoucos (1951), toprakta kireç Allison ve Moodie (1965), üreaz enzimi Hoffmann ve Teicher (1961), katalaz enzimi Beck (1971), toprakta mikroorganizma sayısı Wollum (1982), NO₃⁻ ve NH₄⁺ analizleri Bremner (1965)'e göre yapılmıştır. PLA levhalarda kütle kaybı; ultra hassas terazide (AND-HM-200) PLA ağırlıkları değişimi ISO 17556 göre toprak şartlarında pilot ölçekte yapılan CO₂

veya O₂ ihtiyacı ölçümü metodunun modifiye edilmesiyle aerobik bozunum şartlarındaki PLA levhaların kütle farkları ölçülerek kaydedilmiştir. Biyoplastik levhaların mikroskop görüntüleri Nikon E200Pol polarize petrografik inceleme mikroskobu, görüntü işleme programı NIS Element Analysis D cihazından elde edilmiştir.

2.4. Denemenin kurulması ve verilerin elde edilmesi

Bir litrelik silindirik standart cam kavanozlara 2 mm'lik elekten elenmiş, temel analizleri yapılmış ve hassas terazide tartılmış 400'er gram toprak konulmuştur. Toprak dolu kavanozlara uygulama dozlarına göre arıtma çamurları üçer tekrarlı olarak ilave edilmiş, etiketlenmiş ve kavanozlardaki materyaller homojen olarak karıştırılmıştır. Arıtma çamuru dozlarını belirleyebilmek için arıtma çamurunun ve toprak örneklerinin ağır metal analizleri yapılmış ve 3 Ağustos 2010 tarih ve 27661 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan yönetmelik kapsamındaki (Anonim 2010) tarım topraklarına uygulanabilir maksimum çamur dozları belirlenmiştir.

Çanakkale ileri biyolojik atıksu arıtma tesisinden elde edilen çamurunun ve denemede kullanılan toprağın ağır metal içeriklerine göre uygulama dozları belirlenmiştir. Materyallerin metal içeriklerine göre belirlenen 86g arıtma çamuru; içerisinde 400g toprak bulunan kavanoza karıştırılacak şekilde kuru madde üzerinden hesaplamalar yapılmıştır. Bu dozun yarısı (43g arıtma çamuru/400g toprak) ve iki katı (172g arıtma çamuru/400g toprak) olacak şekilde iki doz daha belirlenmiştir. Ağırlık esasına dayalı olarak 1 kısım çamur: 1 kısım toprak (200g arıtma çamuru/200g toprak) olacak şekilde bir doz ile hiç arıtma çamuru katılmayan kontrol dozu (yalnız 400g toprak içeren) deneme planına eklenmiştir.

Kavanozlardaki topraklar ve karışımlar tarla kapasitesine getirilerek bir hafta 27 °C'de ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Ön inkübasyon sonrası biyobozunur PLA plastik filmler ultra hassas terazide tartılarak kavanozlara yerleştirilmiştir. Kavanozlara PLA yerleştirme işlemi ise; her kavanoza 4'er adet önceden hazırlanan 2 mm gözenek açıklığında dayanıklı polipropilen malzemeden elle yapılmış keselerin içine PLA levhalar (ağırlıkları 0,02-0,05g arasında değişen ve dairesel olarak eş büyüklükte kesilmiş) konularak yaklaşık 45 derecelik açıyla kavanozdaki karışımlara ve kontrol topraklarına gömme şeklinde yapılmıştır. Kavanozların ağzı oksijeni engellemeyecek ve nemi koruyacak özellikte yarı geçirgen plastik bir film (Koroza marka) ile kapatılmış ve mikroorganizmaların PLA levhalarını parçalayabilmesi için gerekli nem tarla kapasitesi düzeyinde tutulmaya çalışılmıştır. Kavanozlar inkübatöre (24 °C'ye) yerleştirilmiş ve iki haftada bir seri örnek incelenmek üzere inkübatörden alınmıştır.

Toplamda dört ay süren denemede ayda iki kez (15 günde bir) alınan örneklerde biyobozunur plastik levhaların kütle kaybı; gömüldükleri topraklarda ise ureaz ve katalaz enzimleri, amonyum ve nitrat analizleri ile toplam mezofil aerobik mikroorganizma sayıları belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, kullanılan arıtma çamurunun toplam çinko (Zn) kapsamı 364.67 mg kg⁻¹, deneme toprağının toplam çinko kapsamı ise 42.44 mg kg⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Görüldüğü gibi Çanakkale belediyesi ileri biyolojik atıksu arıtma tesisi'nden elde edilen arıtma çamuru diğer metallere daha yüksek oranda Zn içermektedir. Bu nedenle bu çalışmada yönetmelik açısından kritik olan ağır metallere olan Zn sınırlayıcı faktör olarak ele alınmıştır. Dolayısıyla arıtma çamurunun maksimum doz miktarı arıtma çamurundaki Zn miktarları dikkate alınarak yönetmeliklerin izin verdiği çinko miktarına göre hesap yoluyla belirlenmiştir. Toprakta on yıllık ortalama esas alınarak bir yılda verilmesine müsaade edilecek ağır metal yükü sınır değerleri dikkate alınarak kuru madde bazında 3000g/da/yıl olarak Zn kısıtlayıcı olmuştur. Bu hesaplama göre bir dekara on yılda kuru madde cinsinden maksimum 26.875 ton arıtma çamurunun uygulanabileceği hesaplanmıştır. Bu maksimum doz kavanozlardaki 400g toprak için 86g kuru arıtma çamuru olarak hesaplanmıştır. Plastiklerin bozunma hızları konusunda ortam neminin önemi nedeniyle, yaptığımız çalışmada toprak ortamını tarla kapasitesinde (biyolojik faaliyetler için optimum nem seviyesi) tutabilmek için "Koroza" marka yarı geçirgen özel bir plastik ambalaj malzemesi kullanılmıştır.

Denemede; kontrol dâhil 5 adet çamur dozu, her dozun 3 tekrarı ve her tekrarda 4 PLA parçası yıkanıp temizlenerek incelenmiştir. Bu da; 5 doz x 3 tekrar x her kavanozda 4 levha x 8 inkübasyon zamanı = 480 adet plastik levhanın incelenmesi anlamına gelmektedir. Her inkübasyon zamanında 5 doz x 3 tekrarı = 15 kavanoz inkübatörden (NÜVE S120 Soğutmalı tip) alınarak plastik levhalardaki kütle kayıpları ve belirtilen diğer toprak özellikler sekizinci inkübasyon dönemindeki son kavanozlarda da incelenerek veriler toplanmıştır.

2.5. Verilerin istatistik analizi

Elde edilen veriler MINITAB 16.0 İstatistik Paket Programı yarımımla varyans analizine tabi tutulmuş, sonuçlar arasındaki farklar En Küçük Asgari Farklara (LSD) göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar kontrol ile yapılan uygulamalara göre değerlendirilerek özellikler arasındaki değişimler farklı harflerle ifade edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

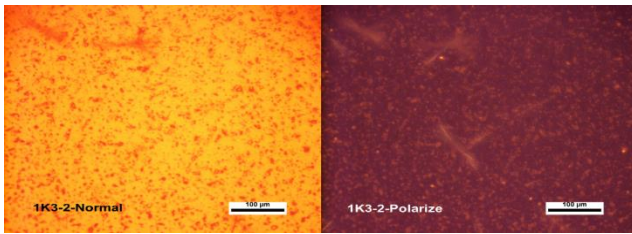
3.1. Biyoplastik levhaların kütle kayıpları

Biyoplastik levhaların kütle kayıpları "örnekleme zamanı"x"arıtma çamuru" interaksyonu yönüyle istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Uzunboy ve Türkmen 2018). Her iki faktör birbirinden bağımsız olarak ele alındığında ise levhaların kütle kayıplarına etkileri önemli olmuştur (p≤0.05). Biyobozunur plastik levhalarda, sekizinci örnekleme (120. gün) zamanındaki "%50 toprak : %50 çamur" dozu şartlarında ağırlık kaybı en fazla olmuştur. Örnekleme zamanına göre en az ağırlık kayıpları tüm dozlarda birinci örnekleme (15. gün) zamanında görülmüştür. Deneme öncesi elastik olan biyoplastik levhaların zaman ilerledikçe ve çamur dozları arttıkça elastikiyet kayıpları olduğu, levhalarda kırılma ve

parçalanmaların gözlemlendiği ve kütle kayıplarının arttığı belirtilmiştir (Uzunboy 2018).

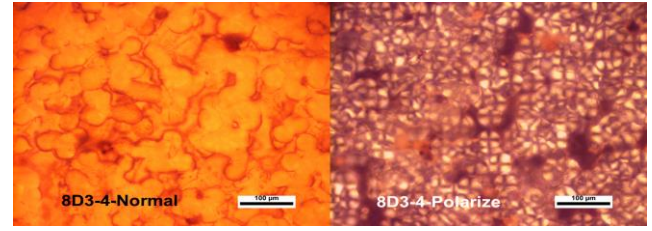
Çalışmamızda arıtma çamuru ile PLA temelli biyobozunur plastik levhalar ilk olarak toprak ortamında buluşturulmuştur. Biyoplastiklerin biyodegradasyon oranlarını etkileyen faktörler, ortam koşulları ve polimer özellikleri olarak iki grupta kategorize edilmiştir (Kale ve ark. 2007a). Araştırmacılar diğer bir araştırmasında PLA malzemeden yapılan iki ambalajı 30 günlük kompostlama koşullarına tabi tutmuş ve fiziksel bozunma özelliklerini 1, 2, 4, 6, 9, 15 ve 30 günlerde ölçmüşler ve plastiklerin başlangıç kristal yapıları ile plastik ambalajların bulunduğu ortam pH'larının bozunma sürecindeki en önemli iki etki olduğunu belirtmişlerdir (Kale ve ark. 2007b). Biyobozunur levhalardaki ağırlık kayıplarındaki değişimlerin nedenlerine zamanla arıtma çamurunun toprak ortamında parçalanmasına dayalı olarak toprak pH sınırını değişimi (Türkmen ve Arcak 2006) ve mikroorganizma sayılarının artması konuları eklenebilir.

Plastikler deponi alanlarına bertaraf edildiklerinde, yapılarında bulunan nişasta mikroorganizmalar tarafından parçalanmakta ancak polietilen gibi sentetik kimyasal maddeler parçalanmadan kalabilmektedirler (Stevens 2002). Plastiklerin bozulma hızları konusunda yapılan başka bir çalışmada; plastik ambalajların başlangıç kristalleri ve L-Laktid kapsamları değiştiğinde bozunum oranlarının da değiştiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada kompost yığının sıcaklığı, bağıl nemi ve pH değerlerinin paketlerin bozulma hızında önemli rol oynadıkları ve bozunma koşullarındaki nispi nem arttıkça, bozunma hızlarının da hızlı arttığını belirtmişlerdir (Ho ve ark. 1999). Bu nedenle çalışmamızda ortam nemini tarla kapasitesinde tutularak gömülü levhaların kütleleri izlenmiştir. Bu şartlarda birinci örneklemede (15. gün) en az ağırlık kaybı kontrol dozu ile 1/2 Maksimum dozun uygulandığı durumda görülmüş ve birinci örneklemede levhalardan alınan polarize mikroskop görüntüleri ile bu durum kayıt altına alınmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Hiç çamur uygulanmayan (Kontrol) dozunda birinci örnekleme dönemindeki (1K3-2) toprağa gömülü biyobozunur plastik levhalardaki normal ve polarize mikroskop (Nikon E200 Pol) görüntüleri (ölçekler 100 mikrondur, görüntüler orijinaldir)

Denemede zaman ilerledikçe biyobozunur levhaların yüzeyinde mikro boyutlarda; çatlaklar, kırılmalar, oyuklar artmış ve polarize mikroskopta ışık geçirgenliği artmıştır. Zamana dayalı olarak biyoplastik levhaların kütle kaybı en çok 4. örneklemede “%50 toprak + %50 çamur” dozunda gözlemlenmiş; bu dozda levhalardaki korozyon (aşınım) nedeniyle oluşan gözenekli yapı son örnekleme dönemlerinde belirginleşmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. En yüksek çamur dozunda (%50 toprak + %50 çamur) son örnekleme dönemindeki (8D3-4) toprağa gömülü biyobozunur plastik levhalardaki normal ve polarize mikroskop (Nikon E200 Pol) görüntüleri (ölçekler 100 mikrondur, görüntüler orijinaldir)

3.2. Toprak mikroorganizmalarının sayısal değişimleri

Elde edilen bulgulara göre “uygulama zamanı x çamur dozları” interaksyonu toprak mikroorganizma sayılarına istatistik olarak önemli etkide bulunmamıştır. Faktörler birbirinden bağımsız olarak ele alındığında ise her iki faktörün mikroorganizma sayılarına etkileri önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$).

Biyoplastiklerin gömüldüğü topraklara hiç arıtma çamurunun uygulanmadığı şartlarda dozlara dayalı olarak gram toprak bazında mikroorganizma sayılarında önemli farklar olmuştur. Kontrol dozunda mikroorganizma sayıları en az (2.5×10^6) olurken en yüksek doz olan 1:1 dozunda bu değer en yüksek olmuştur (17×10^6). Çamur uygulama dozları arttıkça mikroorganizma sayılarında doğrusal artışlar gözlemlenmiştir. Örnekleme zamanına dayalı olarak mikroorganizma sayılarında 2. örneklerde (5.67×10^6) ve 3. örneklerdeki sayılar (6.12×10^6) ile 8. örneklerdeki sayılar (12.28×10^6) arasındaki istatistik farklar önemli olmuştur. Bu durum arıtma çamurunun hiç uygulanmadığı kontrol şartlarında bulunmuş diğer tüm örneklerde sayısal farklar olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Balzer ve Ahrens (1990), killi-tın bir toprakta biyolojik aktivite üzerine 20 yıldır uygulanan arıtma çamurunun etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar; 2.5 t ha^{-1} çamur uygulamasının mineral gübre uygulamasına oranla biyolojik aktiviteyi önemli oranda artırdığını fakat 5 t ha^{-1} ’lık uygulamanın bazı enzim aktiviteleri ve mikrobiyal biyomasa azalışına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Arıtma çamurlarının uzun yıllar boyunca ve yüksek dozda uygulanmaları mikrobiyal biyomasa da olumlu/olumsuz etkileyebilmektedir. Bir kez yapılan çamur uygulamalarının mikrobiyal biyomasa üzerinde olumlu etkileri (Dar 1996; Barbarick ve ark. 2004), uzun yıllar yapılan çamur uygulamalarının ise olumsuz etkilere sahip olduğu araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Balzer ve Ahrens 1990; Stoven ve ark. 2005). Çöp deponi alanlarına PLA gibi nişasta bazlı biyoplastiklerin bertarafının, sentetik polimerler, lignin ve selüloz bazlı biyoplastiklerden daha kolay olduğu belirtilmektedir (Roldán-Carrillo ve ark. 2003; El-Kadi 2010; Accinelli ve ark. 2012).

Dolayısıyla çalışmamızda kullanılan arıtma çamurunun evsel nitelikli olması, ağır metal içeriklerinin nispeten düşük olması (Tablo 1) ve dozları yükseldikçe mikroorganizma sayılarının artması önceki çalışmalarla

uyumlu görülmekte ve arıtma çamurlarının PLA levhalarla birlikte gömülebileceğini düşündürmektedir.

3.3. Uygulamaların toprakta NO_3^- içeriklerine etkisi

Topraklardaki NO_3^- kapsamı üzerine toprağa uygulanan arıtma çamuru miktarlarının (doz), inkübasyon zamanlarının (zaman) ve her iki uygulamanın birlikte etkisi istatistiksel olarak önemli seviyede bulunmuştur ($p < 0.05$). Arıtma çamuru dozları ve zamanın NO_3^- ortalamalarına birlikte etkileri; çamur uygulama dozları arttıkça NO_3^- miktarında artışlar, bütün dozların ortalamaları dikkate alındığında ise örnekleme zamanı ilerledikçe NO_3^- kapsamlarında azalmalar şeklinde gözlemlenmiştir. Toprağa uygulanan arıtma çamuru dozları arasında en yüksek NO_3^- kapsamı beşinci örneklemede (75. gün) “%50 toprak + %50 çamur” dozunda (2471.6 mg kg^{-1}) tespit edilmiş ve bu miktarı ikinci örneklemedeki “2 x Maksimum doz”u (1836.2 mg kg^{-1}) takip etmiştir. En düşük NO_3^- kapsamı ise altıncı örneklemede (90. gün) “kontrol dozu”nda (50.75 mg kg^{-1}) tespit edilmiştir. Genel olarak nitrat değerleri artan çamur dozlarına göre artmış bu artışlar ilerleyen örnekleme zamanına göre ise azalış göstermiştir.

Çetin ve Gür (2011) yaptıkları çalışmada, toprağa karıştırılan organik atıkların nitrat azotu üzerine etkilerinin inkübasyon süresine bağlı olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar topraktaki nitrat azotunun artışına en çok etkiyi tavuk gübresi ve arıtma çamurunun gösterdiğini bildirmişlerdir.

Türkmen ve Arcak (2006)’ın yaptığı çalışmaya göre kireçli bir toprağa farklı düzeylerde uygulanan arıtma çamuru ve azot uygulamalarının etkisi bakımından, uygulama yıllarına göre önemli değişim gösterdiği ve ekstrakte edilebilir NO_3^- kapsamlarının da etkilendiği belirtilmiştir.

Arıtma çamuru uygulama dozlarının artmasıyla toprakta NO_3^- kapsamını arttırması düzenli depolama alanında sızıntı sularında NO_3^- birikim riski yapabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle sızıntı sularının yeraltı su kaynaklarını kirletmemesi amacıyla düzenli depolama alanlarında geçirimsizlik sağlayan yapıların çok iyi planlanması kritiktir. Toprağa uygulanan arıtma çamurunun dozlarının artmasıyla yani ortama verilen organik madde miktarı artışıyla NO_3^- miktarı ve birlikte mikroorganizma faaliyetlerinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Ortamda biriken parçalanma ürünlerinin ve ağır metallerin mikroorganizma faaliyetini olumsuz etkilemesinden dolayı toprakta NO_3^- kapsamında zamanla azalmalar da görülebilir (Balzer ve Ahrens 1990; Stoven ve ark. 2005). Nişasta temelli biyobozunur malzeme ve ileri biyolojik arıtma çamurunun birlikte denendiği, plastik materyalin bozunmasına ek olarak toprak özelliklerindeki değişimlerin ele alındığı başka bir yayına rastlanmamıştır.

3.4. Uygulamaların toprakta NH_4^+ içeriklerine etkisi

Topraklardaki NH_4^+ içeriği üzerine uygulanan arıtma çamurunun, inkübasyon zamanlarının ve her ikisinin birlikte etkisi (interaksiyonu) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu çalışmada kullanılan arıtma çamuru uygulama dozları arttıkça NH_4^+ miktarında artış

gözlemlenirken; bütün dozların ortalamaları dikkate alındığında inkübasyon zamanı arttıkça NH_4^+ kapsamlarında azalmalar gözlemlenmiştir. Samaras ve ark (2008), yaptıkları çalışmada artan miktarlarda arıtma çamurunun uygulanan toprağın organik madde kapsamını ve toplam azot içeriklerini arttırdığını; bu artışların istatistik açıdan önemli olduğunu vurgulamışlardır. Uygulanan arıtma çamuru dozları arasında en yüksek NH_4^+ kapsamı beşinci örneklemede “%50 toprak + %50 çamur” dozunda (11283 mg kg^{-1}) tespit edilmiş ve bu durum dördüncü örnekleminin aynı dozunda da görülmüştür. En düşük NH_4^+ kapsamı ise altıncı örnekleminin “kontrol doz”unda (23.43 mg kg^{-1}) tespit edilmiştir. Kontrol dozunun ortalama verileri arasında en yüksek NH_4^+ kapsamı ise yedinci örnekleme (105. gün) sonunda 56.82 mg kg^{-1} olarak ölçülmüştür.

Çamur dozları arttıkça ortamdaki organik madde miktarının artmış olması ve bunun sonucunda mikroorganizma faaliyetlerinin artışları toprakta NH_4^+ miktarını özellikle 4. 5. ve 6. örnekleme zamanlarında arttırmıştır. Ortamda biriken parçalanma ürünlerinin ve ağır metallerin zamanla mikroorganizma faaliyetini olumsuz etkileyebilmeleri nedeniyle toprakta NH_4^+ içeriğinin de zamana bağımlı olarak değişebildiği belirtilmektedir (Balzer ve Ahrens 1990; Stoven ve ark. 2005; Samaras ve ark. 2008).

3.5. Uygulamaların toprakta üreaz enzimine etkisi

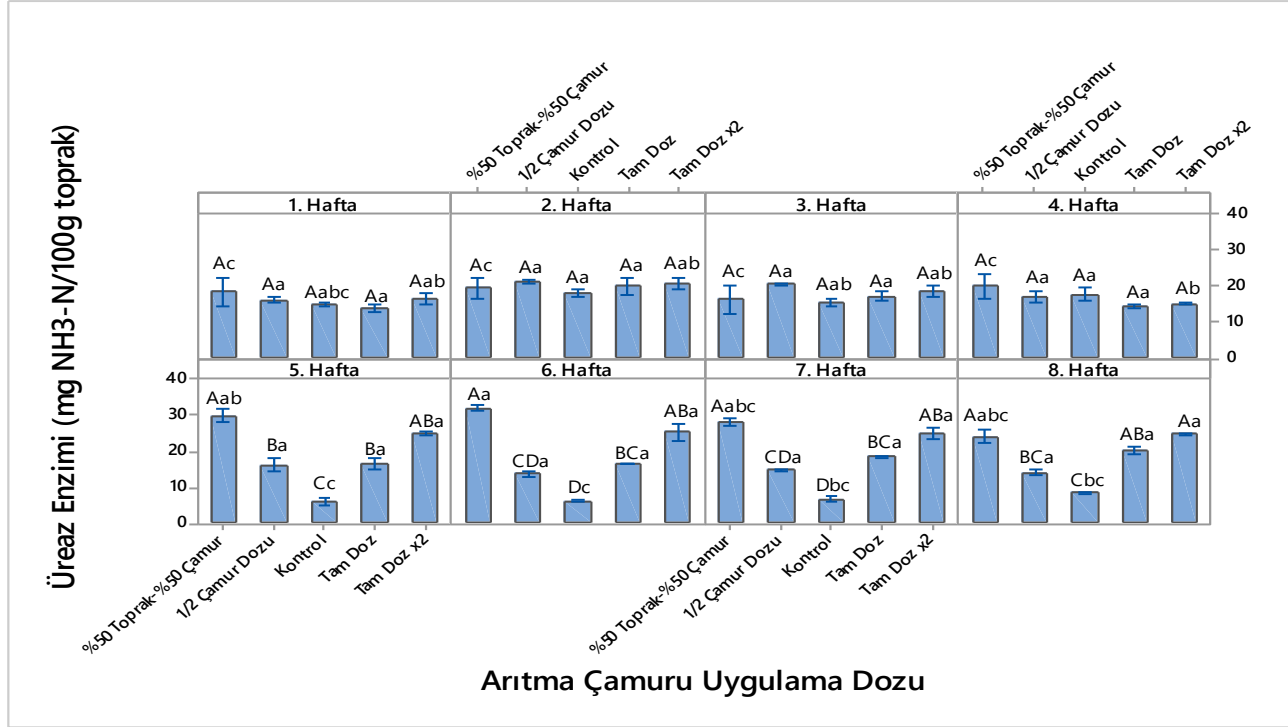
Çalışmamızdan elde edilen verilere göre topraklardaki üreaz enzim aktivitesi üzerine toprağa uygulanan arıtma çamuru dozları, örnekleme zamanları ve her ikisinin birlikte etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Üreaz, karbondioksit ve amonyağa hidroliz olmasını sağlayan ve hidrolitik bir enzim olan üreaz, tarımda önemli bir kimyasal gübre girdisi olan “Üre”nin toprakta ayrışmasını ve yararlı hale gelmesini ve dolayısıyla performansını büyük ölçüde etkileyen enzimdir (Frankenberger ve Dick 1983; Haktanır ve Arcak 1997; Arcak ve ark. 2000). Topraklarda üreaz enzimi, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilmekte ve topraktaki mikroorganizmaların %1-20’sinin üreaz enzimi ürettiği bildirilmektedir (Fisher ve ark. 2017).

Çalışmamızda arıtma çamuru dozları arasında en yüksek üreaz enzim aktivitesi altıncı örneklemede “%50 toprak+%50 çamur” dozunda 32.17 mg $\text{NH}_3\text{-N}/100$ g kuru toprak olarak ölçülmüştür. En düşük üreaz enzim aktivitesi ise yine altıncı örneklemede “½Maksimum” çamur dozunda 8.35 mg $\text{NH}_3\text{-N}/100$ g kuru toprak olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ilk dört örneklemede üreaz değerleri çamur uygulanan diğer dozlardan düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Son dört örneklemede ise en düşük üreaz değerleri yine kontrol dozlarında görülmüştür (Şekil 3).

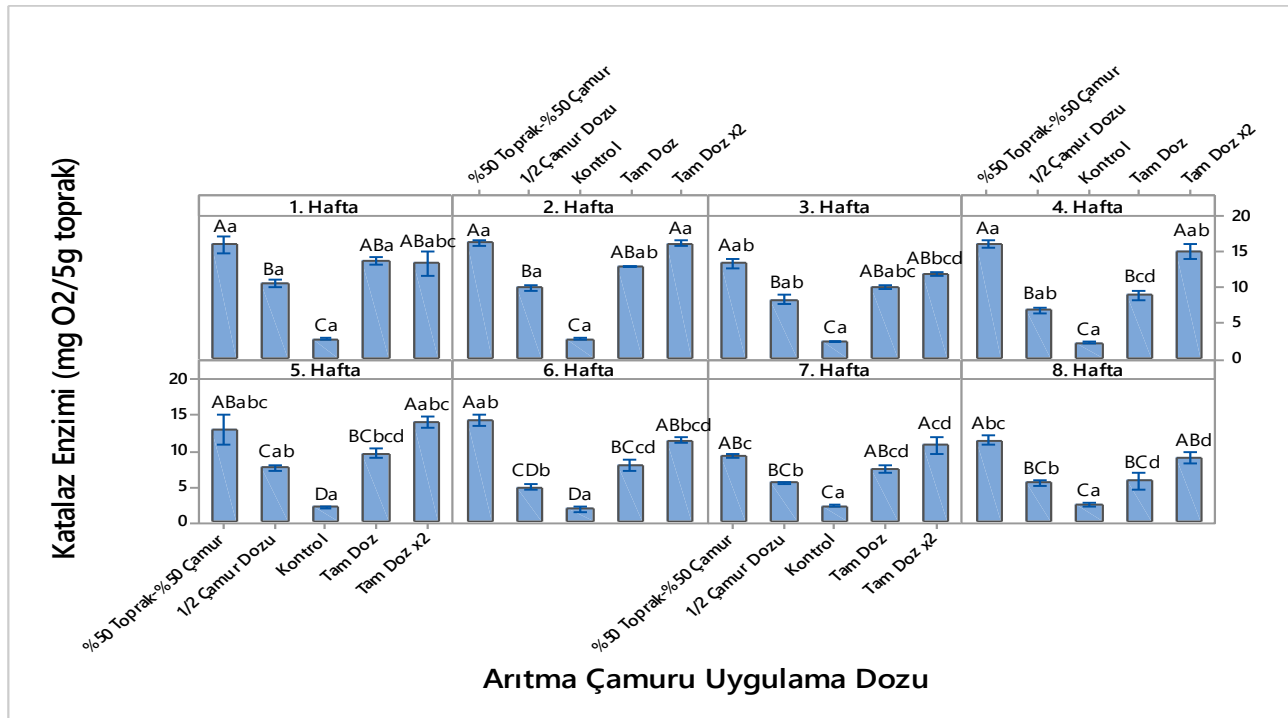
Bu çalışmada kullanılan biyobozunur plastik levhaların son örnekleme zamanlarında kontrol grubunda bozunumlarının artması ve kontrol dâhil tüm dozlardaki üreaz enzim aktivitesi değişimlerinin görülmesi, PLA levhaların parçalanma ürünlerinin de üreaz enzim aktivitesini etkileyebileceğini düşündürmektedir (Uzunboy, 2018). Ankara kenti arıtma çamurunun tarımsal kullanım potansiyeli üzerine yapılan bir çalışmada; kireçli

topraklarda arıtma çamuru uygulamasının pH değerlerini düşürdüğü bildirilmiştir (Arcak ve ark. 2000). Yüksek oranlardaki arıtma çamuru uygulamalarının ise toprağın üreaz aktivitesini önemli derecede artırdığı belirtilmiştir (Frankenberger ve ark. 1983; Ataman ve ark. 2000). Arıtma

çamuru uygulamalarının toprakta üreaz enzim aktivitesini arttırmış, ancak bu artışların zamana göre düzensiz değiştiği gözlemlenmiştir. Araştırmamızda çamur dozlarının artışına bağlı olarak üreaz değerlerindeki önemli artışlar özellikle son dört örneklemede görülmüştür.



Şekil 3. Arıtma çamuru dozlarının toprağın üreaz enzimi kapsamına etkisi: Aynı "hafta"da (örneklemede) farklı büyük harflerle gösterilen "doz" ortalama farkları önemlidir ($p \leq 0.05$). Aynı "doz"da farklı küçük harflerle gösterilen "hafta" ortalama farkları önemlidir ($p \leq 0.05$).



Şekil 4. Arıtma çamuru dozlarının toprağın katalaz enzimi kapsamına etkisi: Aynı "hafta"da (örneklemede) farklı büyük harflerle gösterilen "doz" ortalama farkları önemlidir ($p \leq 0.05$). Aynı "doz"da farklı küçük harflerle gösterilen "hafta" ortalama farkları önemlidir ($p \leq 0.05$).

Zamana göre farklı dozlarda görülen düzensizlik literatürde de belirtilmiştir (Frankenberger ve ark. 1983). Bu durum toprağa uygulanan çamur dozlarına, ortama eklenen organik madde miktarına, mikroorganizma popülasyonuna, ortamdaki elementlere göre değişmektedir (Fisher ve ark. 2017).

3.6. Uygulamaların toprakta katalaz enzimine etkisi

Araştırmamızda kullanılan toprakların katalaz enzim aktivitesi üzerine uygulanan çamur miktarlarının, inkübasyon zamanlarının ve her ikisinin birlikte etkisi (interaksiyonu) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Aritma çamurunun bütün dozlarında inkübasyon zamanı arttıkça katalaz enzim aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Toprağa uygulanan arıtma çamuru dozları arasında en yüksek katalaz enzimi kapsamı ikinci örnekleme zamanındaki “%50 toprak + %50 çamur” dozunda en fazla tespit edilmiş ve bunu yine aynı dönemde “2x Maksimum çamur” dozu takip etmiştir.

En düşük katalaz enzimi kapsamı ise altıncı örnekleme zamanındaki “½ maksimum çamur” dozunda tespit edilmiştir. Toprakta kontrol dozu örneklerinin ortalamaları arasında en düşük katalaz enzimi kapsamı altıncı örnekleme zamanında tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol dozunun zaman ortalamalarında en yüksek katalaz aktivitesi ikinci örneklemede görülmüştür (Şekil 4).

Katalaz, canlılar için zehirli olan hidrojen peroksiti su ve hidrojene parçalayan enzimdir (Liu ve ark. 2008). Katalazın substratı olan hidrojen peroksitin mikroorganizmalar için toksik ve ölümcül olduğu açıklanmıştır (Frankenberger ve Dick 1983).

Tüm aerobik ve mikroaerofil bakterilerin H_2O_2 'i oksijen ve suya parçaladığı bilinmektedir. Hidrojen peroksitin parçalanmasının, ortamdaki H_2O_2 substrat miktarına, katalaz enzim aktivitesine ve diğer enzimlerde olduğu gibi; aerobik mikroorganizma popülasyonu, ortam pH'sı, sıcaklık, inhibitörler ve stimülatörlere bağımlı olduğu bildirilmiştir (Frankenberger ve Dick 1983; Liu ve ark. 2008).

Riozin ve Egorov (1972)'nin yaptıkları çalışmaya göre, katalaz enzim aktivitesi ile toprak organik maddesi arasında ilişki olduğu, buna karşın toprakların mikroorganizma sayılarında ise benzer ilişkinin bulunmadığını belirlemişlerdir.

Tresar-Cepeda ve ark. (2008)'na göre ise toprakta katalaz aktivitesinin; kil içeriği, toprak nemi, toprak derinliği, sıcaklık, organik madde miktarı, pH, toprak tipine göre farklılık gösterdiği ve aktivitenin toprak işlenmesiyle artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Alef ve Nannipieri (1995) tarafından yapılan bir araştırmada; katalaz aktivitesinin toprakta çok durağan olduğunu rapor edilmiştir. Ancak bazı araştırmacılar ise; katalazın toprak derinliği ile azaldığını, toprak pH'sı ile değiştiği, toprak derinliği ve organik karbon içeriği ile önemli ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir (Fisher ve ark. 2017; Kravkaz-Kuscu ve ark. 2018).

4. Sonuç ve Öneriler

Günümüzde geleneksel petrol türevli plastiklerin yerini giderek biyobozunur plastiklerin alması ve buna bağlı olarak biyoplastik tüketiminin artması nedeniyle oluşan biyoplastik atıkların doğada biyoparçalanabilirlik özellikleri önem kazanmıştır. Küresel boyutlarda artan kentleşme ve endüstrileşme nedeniyle yüksek miktarlarda oluşan arıtma çamurlarının uzaklaştırılması da diğer bir önemli çevre problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Arıtma çamurları ve katı atıkların birlikte düzenli deponi alanlarında depolanması veya katı atıklarla birlikte kompostlanması üzerine çalışmalara rastlanmaktadır. Ancak katı atıklar içinde oranı giderek artan biyobozunur plastiklerle arıtma çamurlarının birlikte bir arada depolanması konularında yeterli çalışmalar bulunmamaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmamızda arıtma çamurlarının biyoplastiklerle birlikte toprak ortamında depolanması durumunda biyoplastiklerin hangi oranlarda arıtma çamuru karıştırılması durumunda ne oranda mineralizasyona uğradıkları ve bu süreçte toprak özelliklerinde nasıl değişimler gözlemlendiği sorularına cevaplar aranmıştır.

Yapılan dört aylık çalışmayla biyoplastik levhaların kütle kayıpları, toprağın amonyum ve nitrat değişimleri, mikroorganizma sayıları, toprak enzim aktiviteleri izlenmiştir. Elde edilen verilere göre biyobozunur plastiklerin bozunum sürecinde arıtma çamuru oranının artışıyla plastiklerin bozunum oranının arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre biyoplastiklerin düzenli katı atık depolama alanlarına kentsel arıtma çamurlarıyla birlikte uygulanması durumunda biyoplastiklerin bozunma sürecinin hızlanabileceği söylenebilir.

Ayrıca uygulanan arıtma çamuru dozu arttıkça toprakta NH_4^+ , NO_3^- , mikrobiyal aktivite, üreaz ve katalaz enzimleri miktarlarında da artış tespit edilmiştir. Ancak zaman faktörü bakımından elde edilen veriler incelendiğinde zaman arttıkça toprağın NH_4^+ , NO_3^- , mikrobiyal aktivite, üreaz ve katalaz enzimleri miktarlarında dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak arıtma çamurunun içerdiği yüksek organik madde ve mineral madde kapsamının toprağın zamanla NH_4^+ , NO_3^- miktarları ile diğer biyolojik özelliklerine olumlu/olumsuz etkiler yaptığı; arıtma çamuru dozları ile incelenen özellikler arasında pozitif ilişkiler görülürken zaman faktörüne göre katalaz, NH_4^+ ve NO_3^- özellikleri olumsuz etkilenmiştir. Biyobozunur plastiklerin katı atık düzenli deponi alanlarında arıtma çamuru ile birlikte uygulanması durumunda bozunma sürecine en fazla etki eden uygulamanın “1:1” dozu olduğu anlaşılmıştır. Arıtma çamuru miktarları katı atıkların kontrolü yönetmeliği gereği en yüksek ağır metal içeriği dikkate alınarak hesaplandığı için tarım alanlarında uygulanamayacak kadar yüksek dozlar (%50 toprak + %50 atık çamur ve 2 x maksimum dozlar) da bu çalışmada denenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmayla; arıtma çamurlarının düzenli deponi alanlarında biyobozunur plastiklerle birlikte bastırılabilmesi ve biyoplastiklerin düzenli deponi alanlarında daha hızlı ayrışıp parçalanabileceği

öngörülmüştür. Ancak tarım alanı topraklarına izin verilebilecek çamur dozlarının biyobozunur plastiklerin mineralizasyonuna etkisinin doğal arazi şartlarında yeterli olmayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle arıtma çamurunun farklı dozları ve değişik biyobozunur materyaller önce inkübasyon şartlarında, sonra arazi şartlarında yeni çalışmalarla denenmelidir. Bu tür çalışmalarda ele alınacak çamur dozları her arıtma tesisinden elde edilen arıtma çamurlarının ağır metalleri farklı miktarlarda içerebileceklerinden ayrı ayrı araştırılmalıdır. Ayrıca çevre sağlığı açısından biyobozunur plastiklerin düşük dozlarda arıtma çamuru eşliğindeki mineralizasyonu sürecinde, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi parçalanma ürünlerinin de detaylı çalışılması gerektiği belirtilebilir.

Teşekkür

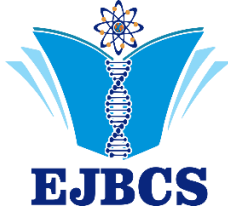
Bu araştırma; ÇOMÜ BAP Komisyonu Başkanlığı tarafından ÇÖMÜ FYL-2016-1052 No'lu Proje numarasıyla desteklenmiş olup; ÇOMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı öğrencisi Nurgül Uzunboy'un yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir.

Kaynaklar

- Aguado J, Serrano DP. 1999. Feedstock Recycling of Plastic Wastes. Royal Soc of Chem, Cambridge, UK, pp 1-23, 85, 86.
- Alef A, Nannipieri P. 1995. Catalase activity. In: Methods in App Soil Microbiol and Biochem, Academic Press, London, UK.
- Allison LE, Moodie CD. 1965. Carbonate. In: Methods of Soil Analysis, Part 2. Agronomy 9: 1379-1400, Am Soc of Agron, Inc, Madison, Wisconsin, USA.
- Allmaras RR, Gardner CO. 1956. Soil Sampling for Moisture Determination in Irrigation Experiments. Agr Jour, 48: 15-17.
- Anonim 2010. Katı Atıkların Kontrolü Yönetmeliği (3 Ağustos 2010 tarih ve 27661 sayılı Resmi Gazete).
- Anonim 2012. Good Practices in Sludge Management, PURE (Project on Urban Reduction of Eutrophication) Union of the Baltic Cities Environment Commission, Finland https://www.ubc-sustainable.net/sites/www.ubc-environment.net/files/publications/pure_actions_for_baltic_sea_protection.pdf (erişim tarihi: 10.02.2020).
- Anonim 2019a. Plastics – the Facts 2019, An analysis of European plastics production, demand and waste data-2019, Belçika, <https://www.plasticseurope.org> (erişim tarihi: 19.02.2020).
- Anonim, 2019b. Türkiye İstatistik Kurumu, Belediye Atıksu İstatistikleri, 2019, haber bülteni, Sayı: 30667.
- Arcak S, Haktanır K, Karaca A, Türkmen C, Turgay OC, İşbilir F. 2000. Ankara Atıksu Arıtma Tesisi Çamurlarının Tarımda Kullanılma Olanaklarının Araştırılması. TUBİTAK Proje No: TOGTAG-1712, 57s.
- ASTM D 5988-03. 2003. Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials or residual plastic materials after composting. ASTM Int, West Conshohocken, PA USA.
- Ataman Ş, Arcak S. 2000. Effects of The Sewage Sludge of Ankara Waste Water Treatment Plant on Some Soil Biological Activities, International Symposium on Desertification-2000, Konya, Türkiye.

- Aydın S. 2004. Atıksu Arıtma Tesisi Çamurlarının Değişik Amaçlarla Kullanımının Araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Balzer W, Ahrens E. 1990. The effect of long-term sewage sludge application on the microbial activity in a silty loam. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs-und Forschungsanstalten, Reihe Kongress, 30: 479-484.
- Barbarick K, Doxtader KG, Redente EF, Brobst RB. 2004. Biosolids Effects on Microbial Activity in Scrubland and Grassland Soil. Soil Sci, 169(3): 176-187.
- Beck TH. 1971. Die Messung Katalasen Aktivitaet Boden Z Pflanzenernachai Sodek, 130: 68–81.
- Berrow ML, Stein WM. 1983. Extraction of metals from soils and sewage sludges by refluxing with aqua regia. Analyst, 108(1283), 277-285.
- Beyatlı Y. 1996. Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, KÜKEM Dergisi, 19(2): 23-32.
- Bilgin N. 1997. Arıtma çamuru ve Türkiye'de Katı Atıkların Kontrolü Yönetmeliği üzerine görüşler. Standard, Mayıs 1997, 113-117.
- Bouyoucos GJ. 1951. A Recalibration of Hydrometer Method for Making Mechanical Analysis of Soils. Agron J, 43: 434-438.
- Bremner JM. 1965. İnorganic forms of nitrogen In: C.A. Black et al (ed). Methods of Soil Analysis, Part 2. Agronomy 9: 1179-1237. Am Soc of Agron, Inc Madison, Wisconsin, USA.
- Bruce AM, Davis RD. 1988. Sewage Sludge Disposal: Current and Future Options. Water Sci Techn, 21(10-11): 1113–1128.
- Cheng-Cheng F. 2011. Bio plastics development planning in Thailand, Invest in Taiwan. http://investtaiwan.nat.gov.tw/news/ind_news_eng_display.js?p?newsid=72 (erişim tarihi: 15.06.2015).
- Çetin Ü, Gür K. 2011. Çeşitli Organik Atıkların Toprağın Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 25(3): 9-16.
- Dar GH 1996. Effects of Cadmium and Sewage Sludge on Soil Microbial Biomass and Enzyme Activities. Bioresearch Techn, 56(2-3): 141-145.
- Davis G, Song JH. 2006. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. Industrial crops and products, 23(2): 147-161.
- DIN EN ISO-1172. 1998. Textilglasverstärkte Kunststoffe – Prepregs, Formmassen und Laminate – Bestimmung des Textilglas- und Mineralfüllstoffgehalts – Kalzinierungsverfahren. Normenausschuss Kunststoffe (FNK) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Normenstelle Luftfahrt (NL) im DIN, Beuth-Verlag, Berlin, (1998).
- El-Kadi S. 2010. Bioplastic Production Form Inexpensive Sources Bacterial Biosynthesis, Cultivation System, Production and Biodegradability, VDM Publishing House, ABD, 145p.
- Filibeli A. 1996. Arıtma Çamurlarının İşlenmesi. Dokuz Eylül Ü, Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 255, İzmir.
- Fisher KA, Yarwood SA, James BR. 2017. Soil urease activity and bacterial ureC gene copy numbers: effect of pH. Geoderma, 285: 1-8.
- Frankenberger Jr WT, Dick WA. 1983. Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. Soil Sci Soc Am J, 47: 945-951.

- Frankenberger Jr WT, Johanson JB, Nelson CO. 1983. Urease activity in sewage sludge-amended soils. *Soil Biol and Biochem*, 15(5), 543-549.
- Gaspard P, Wiart J, Schwartzbrod J. 1997. Parasitological contamination of urban sludge used for agricultural purposes. *Waste Management and Res*, 15:429-436.
- Grewelling T, Peech M 1960. Chemical Soil Test. *Cornel Univ Agr Exp Sta Bull* 960. Hand Book 60, US Dept of Agriculture.
- Haktanır K, Arcak S. 1997. Toprak Biyolojisi (Toprak Ekosistemine Giriş). Ankara Üniversitesi Yayınları: (1486), Ziraat Fakültesi Yayınları: (447), Ankara.
- Ho KLG, Pometto AL, Hinz PN. 1999. Effects of temperature and relative humidity on polylactic acid plastic degradation. *J of environ polymer degr*, 7(2): 83-92.
- Hoffmann GG, Teicher K. 1961. Ein kolorimetrisches verfahren zur bestimmung der ureaseaktivität in Böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 95(1): 55-63.
- ISO 17556 Plastics - Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide evolved. Organization for Standardization. 2012. Available at: www.iso.org (Erişim tarihi; 1 Şubat 2019).
- Jackson ML. 1958. *Soil Chemical Analysis*. Prentice-Hall, Inc Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Kale G, Kijchavengkul T, Auras R, Rubino M, Selke SE, Singh SP. 2007a. Compostability of bioplastic packaging materials: an overview. *Macromolecular biosci*, 7(3): 255-277.
- Kale G, Auras R, Singh SP. 2007b. Comparison of the degradability of poly (lactide) packages in composting and ambient exposure conditions. *Packag Techn Sci*, 20: 49-70.
- Klute A. 1986. Water Retention: Laboratory Methods. *Methods of Soil Analysis Part 1*. 2nd Ed Agronomy 9. Am Soc Argon, 635-660, Madison, USA.
- Köksal Ö, Er BA, Ardali Y, Sağlam M. 2019. Biyoplastiklerin Biyodegradasyonu. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4(2), 151-167.
- Kravkaz-Kuscu IS, Cetin M, Yigit N, Savaci G, Sevik H. 2018. Relationship between Enzyme Activity (Urease-Catalase) and Nutrient Element in Soil Use. *Polish J of Environ Studies*, 27(5).
- Liu J, Xie J, Chu Y, Sun C, Chen C, Wang Q. 2008. Combined effect of cypermethrin and copper on catalase activity in soil. *J of Soils and Sediments*, 8: 327-332.
- Lörcks J. 1998. Properties and applications of compostable starch-based plastic material. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3): 245-249.
- Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera ER. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Curr Op in Microbiol*, 6: 251-260.
- Ma X, Chang PR, Yu J, Stumborg M. 2009. Properties of biodegradable citric acid modified granular starch/thermoplastic pea starch composites. *Carbohydrate Polymers*, 75: 1-8.
- Momani B. 2009. Assessment of the Impacts of Bioplastics: Energy usage, fossil fuel usage, pollution, health effects, effects on the food supply, and economic effects compared to petroleum based plastics. An Interactive Qualifying Project Report, Submitted to the Faculty of the Worcester Polytechnic Institute, <http://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-031609-205515/unrestricted/bioplastics.pdf> (erişim tarihi: 28.12.2017).
- Page WJ. 1992. Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotoacter vinelandii* UWD. *Biotech Letters*, 14(5): 385-390.
- Rajendran N, Puppala S, Sneha Raj M, Ruth Angeeleena B, Rajam C. 2012. Seaweeds can be a new source for bioplastics. *J of Pharmacy Res* 5(3): 1476-1479.
- Reddy MM, Misra M, Mohanty AK. 2012. Bio-based materials in the new bio-economy. *American Institute of Chemical Engineering (AIChE), Chem Engin Proses (CEP)*, www.aiche.org/cep (erişim tarihi: 28.12.2017).
- Richards LA. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils, 78(2): 154, LWW.
- Riozin MB, Egorov VI. 1972. Biological Activity of Podzolic Soils of the Kola Peninsula. *Pochvovedenie* (3), 106-114.
- Samaras V, Tsadilas CD, Stamatidis S. 2008. Effects of repeated application of municipal sewage sludge on soil fertility, Cotton Yield, and Nitrate Leaching. *Agr Journal*, 100(3): 477-483.
- Sarasa J, Gracia JM, Javierre C. 2008. Study of the biodegradation of a bioplastic material waste. *Bioresource Techn*, 100: 3764-3768.
- Stevens ES. 2002. *Green Plastics: An Introduction to the New Science of Biodegradable Plastics*. Princeton Uni Press, ABD, 238s.
- Stoven K, Al-Issa A, Rogasik J, Kratz S, Schung E. 2005. Effect of Long Term Sewage Sludge Applications on Microorganisms in an Arable Soil. *Landbauforschung Volkanrode*, 55(4): 219-226.
- Topbaş MT, Brohi AR, Karaman MR. 1998. Çevre Kirliliği, T C Çevre Bakanlığı Yayınları, Ankara.
- Tresar-Cepeda C, Leiros MC, Seoane S, Gill-Sotres C. 2008. Biochemical properties of soils under crop rotation. *App Soil Ecol*, (39): 133-143.
- Türkmen C, Arcak S. 2006. Kentsel Arıtma Çamuru ve Azot Uygulamalarının Kireçli Topraklarda Bazı Toprak Özelliklerine Etkileri. *Selçuk Ü, Ziraat Fak Dergisi* 20(40): 121-130.
- Udom BE, Mbagwu JSC, Adesodun JK, Agbim NN. 2004. Distributions of zinc, copper, cadmium and lead in a tropical ultisol after long-term disposal of sewage sludge. *Environment International*, 30: 467-470.
- Uzunboy N. 2018. Arıtma Çamurunun Toprakta Biyobozunur Plastiğin Mineralizasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye (Yayınlanmamış).
- Uzunboy N, Türkmen C. 2018. Kentsel Arıtma Çamurunun Biyobozunur Plastiğin Kütle Kaybına Etkisi. *ÇOMÜ Ziraat Fak Dergisi*, 6:275-280.
- Wollum AG. 1982. Cultural Methods for Soil Microorganisms. In: AL Page et al (Eds), *Methods of soil analysis 2 nd edition, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*, SSSA Book Series (9), Madison WI, USA, pp 781-802.
- Wu CS. 2009. Renewable resource-based composites of recycled natural fibers and maleated polylactide bioplastic: Characterization and biodegradability. *Polymer Degradation and Stability* 94:1076-1084.



Rutin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antioksidan Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Gizem Beyoğlu^{1*}, Özlem Araç^{1*}, Derya Taşkın¹, Pelin Pelit Arayıcı¹, Kadriye Kızılbey², Serap Derman^{1**}

¹Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

**Corresponding author : serapacar5@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-6662-6642>

Received : 07/05/2020
Accepted : 01/12/2020

Özet: Kuersetin glikozitlerinden biri olan rutin esas olarak meyve kabukları, yaprakları, çiçekleri ve kökleri gibi bitkilerin farklı kısımlarında bulunan bir flavanoiddir. Kimyasal yapısı nedeniyle antioksidan, antimikrobiyal ve şelatlayıcı özellikleri bulunan rutin molekülünün zayıf çözünürlüğü nedeniyle canlı sistemde biyoyararlanımı oldukça düşüktür. Bu çalışmada, rutin molekülünün biyoyararlanımını artırmak için iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak rutin yüklü kitosan nanopartikülleri sentezlenmiş ve in vitro ortamda salımları ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Üretilen rutin yüklü kitosan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve etken yükleme kapasitesi UV-Vis spektrofotometre kullanılarak; parçacık boyutu, çoklu dağılım indeksi ve zeta potansiyel değerleri ise Foton Korelasyon Spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Bu nanopartiküllerdeki polimer-etken molekül etkileşimleri FT-IR ile incelenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği ve etken yükleme kapasitesi göz önüne alınarak salım deneyleri için optimum nanopartikül Rutin yüklü Kitosan Nanopartikül3 (R-Chi NPs₃) olarak belirlenmiştir. In vitro salım çalışması 17 gün devam ettirilmiş ve bu sürenin sonunda %88.8 oranında rutin salımı gözlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin antioksidan aktivite çalışması ise DPPH yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup R-Chi NPs₃ nanopartiküllerin antioksidan aktivitesinin artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı ve 0.8 mg/mL R-Chi NPs₃ içeren örneğin %88.1 antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma, biyoyararlanımı düşük olan moleküllerin etkilerini artırmak için kontrollü salım yapabilecek gelişmiş biyoteknolojik sistemlerin tasarlanabileceğini gösteren bir araştırma niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Rutin, Kitosan, Nanopartikül, Antioksidan Aktivite, DPPH

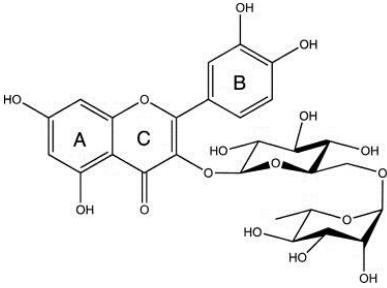
The Synthesis, Characterization and Determination of Antioxidant Activity of Rutin Loaded Chitosan Nanoparticles

Abstract: Rutin, one of the quercetin glycosides, is a flavanoid mainly found in different parts of plants such as fruit peels, leaves, flowers and roots. Although it has antioxidant, antimicrobial and chelating properties due to its chemical structure and its bioavailability in living system is very low due to its poor solubility. In this study, to increase the bioavailability of the rutin molecule, rutin loaded chitosan nanoparticles were synthesized by ionic gelling method and their in vitro releasing studies and antioxidant activities were investigated. The encapsulation efficiency and effective loading capacity of the rutin loaded chitosan nanoparticles were analyzed by UV-Vis spectrophotometer, and particle size, multiple distribution index and zeta potential values were analyzed by Photon Correlation Spectroscopy. Polymer-active molecule interactions of these nanoparticles were examined by FT-IR spectroscopy. The optimum nanoparticle for releasing studies was determined as Rutin-loaded Chitosan Nanoparticles3 (R-Chi NPs₃) considering the encapsulation efficiency and effective loading capacity. In-vitro releasing study was continued for 17 days and at the end of this time 88.8 % rutin release was observed. The antioxidant activity study of the synthesized nanoparticles was carried out by DPPH method, and the antioxidant activity of R-Chi NPs₃ nanoparticles increased due to increasing concentration and it was determined that they showed 88.1% antioxidant activity with 0.8 mg/mL R-Chi NPs₃ concentration. This study is a research study showing that advanced biotechnological systems that can make controlled release can be designed to increase the effects of molecules with low bioavailability.

Keywords: Rutin, Chitosan, Nanoparticle, Antioxidant Activity, DPPH

1. Giriş

Bitkilerde ultraviyole ışınlarına ve hastalıklara karşı koruyucu olarak sentezlenen (Kreft ve ark. 2006) rutin (kuersetin-3-O-rutinozit) molekülü, P vitamini olarak da bilinen bir flavonol glikozittir (Şekil 1). Bu molekül esas olarak meyve kabukları, yaprakları, çiçekleri ve kökleri gibi bitkilerin farklı kısımlarında bulunur. Farmasötik endüstrisinde önemli flavonoidlerden biri olduğu için fonksiyonel gıdalar, ilaç ve gıda takviyesi üretiminde kullanılabilmesi belirtilmiştir (Frutos ve ark. 2019). Ayrıca yapılan çalışmalarda rutin molekülünün; anti-alerjik (Sharma ve ark. 2013), anti-inflamatuar (Kim ve ark. 2004), anti-tümöral (Pilorget ve ark. 2003), anti-bakteriyel (Ananth ve ark. 2015) ve anti-viral (Zandi ve ark. 2011) özellikleri olduğu da gösterilmiştir. Rutin, sahip olduğu büyük molekül ağırlığı ve hidrofobik karakterinden (0.125g/L) dolayı biyoyararlanımı zayıf bir moleküldür (Frutos ve ark. 2019). Graefe ve ark.'nın rutin molekülünde bulunan şeker parçasının rutin emilimi üzerindeki etkisini incelemek için yaptıkları çalışmada, 200 mg rutin alımı sonucu maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks}) $0.3 \pm 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$, maksimum konsantrasyona ulaşma süresi (t_{maks}) 7.0 ± 2.9 saat ve yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) 11.8 ± 3 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. Rutin Molekülünün Kimyasal Yapısı (Nguyen ve ark. 2013)

Rutin stabilizasyonu ve biyoyararlanımının iyileştirilmesi için polimer ya da lipit tabanlı, nano boyutlu, ilaç taşıyıcı sistemler tercih edilmektedir. Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler yüklü molekülün emilim profilini önemli ölçüde etkilemektedir (Bilia ve ark. 2014). Nanopartiküller mikron altı boyutlarda katı, koloidal partikül sistemlerdir (Agrawal ve ark. 2020) ve genel olarak ilaçların hücresel veya doku hedefli dağıtımını sağlamak, biyoyararlanımı arttırmak ve ilaç salımını belirli bir zaman aralığında kontrollü olarak sürdürmek için kullanılırlar (Davidson ve Kehoe 2015). Nanopartiküller yüksek oranda aktif madde taşıyabilme kapasitesine sahip (Nagarwal ve ark. 2009), degradasyon ürünleri toksik olmayan, biyoyumlu ve biyobozunur yapıdadır (Derman ve ark. 2013).

Albumin, jelatin, kitosan, aljinat, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerik nanopartiküllerin üretilmesinde yaygın olarak kullanılan doğal ve sentetik polimerlere örnek olarak verilebilir. Kitosan, kitinin alkali koşullar altında deasetilasyonu veya kitin deasetilaz varlığında enzimatik hidrolizi yoluyla elde edilen (De Queiroz Antonino ve ark.

2017) doğal bir polisakarittir (Peniche ve Peniche 2011). Kitosan biyoyumlu, biyoadhezif, biyoaktif ve non-toksik olması sebebiyle nanopartikül üretiminde sıkça tercih edilen doğal bir polimerdir (Peniche ve Peniche 2011). İyonik çapraz bağ yapısına sahip kitosan ile oluşturulan nanopartiküller ilaçların uzun süre salımını (Sun ve ark. 2010), enzimatik bozulmaya karşı korunmasını sağlama (Sun ve ark. 2010) ve biyolojik olarak parçalanabilme gibi avantajlarına sahiptir (Bernkop-Schnürch ve Dünhaupt 2012).

Bu çalışmada rutin molekülünün biyoyararlanımını arttırmak için iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak rutin yüklü kitosan nanopartikülleri sentezlenmiştir. Nanopartiküllerin % enkapsülasyon etkinliği (%EE), % etken yükleme kapasitesi (%DL), ortalama parçacık boyutu (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI) ve Zeta potansiyel değerleri analiz edilmiş ve optimum nanopartikül belirlenmiştir. Daha sonrasında optimum nanopartikül Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrofotometrede analiz edilmiş, *in vitro* salım özellikleri incelenmiş ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile antioksidan aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metod

Kitosan (orta molekül ağırlıklı, deasetilasyon derecesi: %85), rutin, tripolifosfat (TPP), sodyum hidroksit (NaOH) ve sodyum klorür (NaCl) Sigma Aldrich firmasından, sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Rideld de Haen firmasından, sodyum fosfat dibazik heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Fluka firmasından ve sodyum azid (NaN_3) ise AppliChem firmasından tedarik edilmiştir. Tüm kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktadır. Ultra saf su, laboratuvarında bulunan Millipore MilliQ gradient sisteminden alınmıştır.

2.1. Rutin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Rutin yüklü kitosan nanopartiküllerinin (R-Chi NPs) hazırlanmasında iyonik jelleşme yöntemi kullanılmıştır. Kitosan çözeltisi (%2 a:h), asetik asit çözeltisi (%1 h:h) içerisinde 1 gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak hazırlanmıştır (pH=4.8). R-Chi NPs₁, R-Chi NPs₂ ve R-Chi NPs₃ nanopartiküllerini hazırlamak için 5, 10 ve 20 mg rutin içeren kitosan çözeltileri ve kütlece polimer/TPP oranı 5:1 olacak şekilde TPP çözeltisi (çapraz bağlayıcı) hazırlanmıştır. TPP çözeltisi şırınga yardımıyla rutin içeren kitosan çözeltisi üzerine eklenmiştir. Bu işlem, buz banyosunda sonikasyon (180 sn., 70W, %80 güç) altında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen çözelti santrifüjlenerek (10000 rpm, +4°C, 30dk) süpernatant alınmış %EE ve %DL kapasitesini hesaplamak amacıyla kullanılmıştır. Kalan pellet liyofilize edilerek -20°C'de ileri analizler için saklanmıştır. Boş kitosan nanopartikül (Chi NPs) üretimi için aynı işlemler kitosan çözeltisine rutin eklenmeden yapılmıştır.

2.2. Rutin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

2.2.1. Enkapsülasyon Etkinliği (EE) ve Etken Yükleme Kapasitesinin (DL) Hesaplanması

Rutin yüklü kitosan nanopartiküllerde %EE ve %DL kapasitesinin hesaplanmasında rutin 354 nm'de

Ultraviyole görünür bölge (UV-Vis) spektrofotometresinde (UV1700 Pharma-Sec, Shimadzu, Japonya) alınan absorban değerleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinden faydalanılmıştır (Kirik ve Kızılbey 2019). %EE için Eşitlik (1), %DL için Eşitlik (2)'de gösterilen formüller kullanılmıştır.

$$EE (\%) = \frac{\text{Toplam Rutin miktarı (mg)} - \text{Serbest Rutin miktarı (mg)}}{\text{Toplam Rutin miktarı (mg)}} \times 100 \quad \text{Eşitlik (1)}$$

$$DL (\%) = \frac{\text{Toplam Rutin miktarı} - \text{Serbest Rutin miktarı (mg)}}{\text{Rutin yüklü Nanopartikülün Ağırlığı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik (2)}$$

2.2.2. Ortalama Parçacık Boyutu, Çoklu Dağılım İndeksi ve Zeta Potansiyel Analizi

Üretilen nanopartiküllerin ortalama boyut ölçümleri dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemiyle, nanopartiküllerin zeta potansiyelleri ise elektroforetik ışık saçılması yöntemiyle (ELS) ve Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, İngiltere) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Derman 2015).

2.2.3. FTIR Spektroskopisi Analizi

Rutin, kitosan, Chi NPs ve R-Chi NPs₃'nin kıyaslamalı olarak fonksiyonel grup analizi, ATR (attenuated total reflectance) modunda IR Prestige 21 marka FT-IR Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) kullanılarak 4000-650 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir (Kızılbey 2019).

2.2.4. In-vitro Ortamda Rutin Salımının İncelenmesi

In-vitro salım çalışması; kurutulan rutin yüklü kitosan nanopartiküllerin 4 ml fosfat tamponu (%0.01 NaN₃ içeren PBS, pH=7.4) içerisinde disperse edilmesiyle, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de, 120 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir (Ertugen ve ark. 2020). Belirlenen zaman aralıklarında (1., 2., 4., 24. saat ve 2., 3., 6., 8., 10., 14. ve 17. günlerde) santrifüj yapılarak (10.000 rpm, 30 dk) üst faz alınmış ve yerine taze salım çözeltisi (PBS) eklenmiştir. Elde edilen üst fazın 354 nm'de (Kirik ve Kızılbey 2019) UV-Vis spektrofotometre cihazında absorban değerleri ölçülerek kümülatif salım miktarları tayin edilmiştir.

2.3. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi

Rutin yüklenen kitosan nanopartiküllerinin reaktif oksijen türlerini (ROT) süpürme oranı DPPH yöntemiyle incelenmiştir (Blois 1958). Bu yöntemde, öncelikle 4

mg/mL R-Chi NPs₃ stok çözeltisi ve 100 µM DPPH çözeltisi hazırlanmıştır.

Stok çözeltiden farklı hacimlerde (50, 75, 100, 125, 150, 250 µL) alınarak üzerlerine 1000'er µL DPPH çözeltisi eklenmiş ve her bir çözeltinin son hacmi etanol eklenerek 1250 µL'ye tamamlanmıştır (Kontrol olarak kullanılan gruba nanopartikül çözeltisi eklenmemiştir). Farklı konsantrasyonlarda (0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.8 mg/mL) R-Chi NPs₃ içeren tüm test örnekleri karanlıkta ve oda sıcaklığında 30dk bekletilmiş ve ardından UV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. UV ölçümü sonucunda 517 nm dalga boyundaki absorban değerleri kaydedilerek Eşitlik (3)'de yer alan formüle göre antioksidan aktivite yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\text{Antioksidan Etkinlik (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad \text{Eşitlik (3)}$$

Eşitlik (3)'de A ve B sırasıyla; kontrol olarak kullanılan DPPH çözeltisinin ve örnekle 30 dk. muamele edilmiş DPPH çözeltisinin 517 nm'de göstermiş oldukları absorban değerlerini ifade etmektedir.

3. Bulgular

3.1. Enkapsülasyon Etkinliği (EE)

Enkapsülasyon etkinliği yüksek verimli olan nanopartiküllerin hazırlanması ile malzeme kaybı önemli miktarda azaltılmakta ve üretim maliyetinin düşmesi sağlanmaktadır (Kumar ve ark. 2013; Yeo ve Park 2004;). İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan rutin yüklü kitosan nanopartiküllerine ait %EE sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. R-Chi NPs₁, R-Chi NPs₂ ve R-Chi NPs₃ nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %19.01, %39.95 ve %69.45 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar

literatüre uygun olarak (Budhian ve ark. 2007; Cun ve ark. 2011) nanopartiküle yüklenecek rutin miktarının artması ile %EE'nin de arttığını göstermektedir.

3.2. Etkin Yükleme Kapasitesi (DL)

Hazırlanan tüm NP'ler için %1.13 ve %66.14 arasında ilaç yükleme verimi elde edilmiştir. İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan rutin yüklü kitosan nanopartiküllerine ait % ilaç yüklenme etkinliği sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. R-Chi

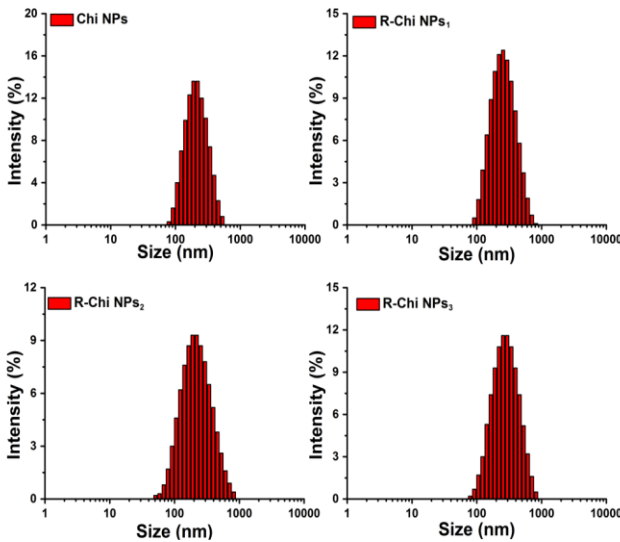
NPs₁ nanopartikülünün ilaç yüklenme verimi %1.13, R-Chi NPs₂ nanopartikülünün ilaç yüklenme verimi %4.71 ve R-Chi NPs₃ nanopartikülünün ilaç yüklenme verimi ise %66.14 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar nanopartiküle yüklenen rutin miktarının artması ile ilaç yükleme veriminin de arttığını göstermektedir. Benzer sonuçlar literatürde farklı moleküller ile yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir (Hao ve ark. 2013).

Tablo 1. Nanopartiküllere Ait %EE, Z-Ave, PDI ve Zeta Potansiyel Değerleri

NP Adı	%EE	%DL	Z-Ave (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
Chi NPs	-	-	183.2±0.36	0.245±0.005	+15.4±1.0
R-Chi NPs ₁	19.01	1.13	217.0±1.80	0.256±0.008	+15.6±0.7
R-Chi NPs ₂	39.95	4.71	210.9±1.20	0.370±0.008	+14.1±0.4
R-Chi NPs ₃	69.45	66.14	244.4±3.69	0.260±0.013	+13.7±0.4

3.3. Parçacık Boyutu Analizi

Rutin yüklü kitosan nanopartiküllerinin karakterizasyonunda ortalama parçacık boyutu için dinamik ışık saçılması yöntemi ve zeta potansiyeli ölçümü için elektroforetik ışık saçılma yöntemi kullanılmıştır. Tablo 1'de, hazırlanan tüm NP' lere ait Z-Ave, PDI ve zeta potansiyel değerleri verilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır. Üretilen nanopartiküllere ait boyut dağılımı sonuçları ise Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2. Boş ve Rutin Yüklü Kitosan Nanopartiküllere Ait Boyut Dağılımı Grafikleri

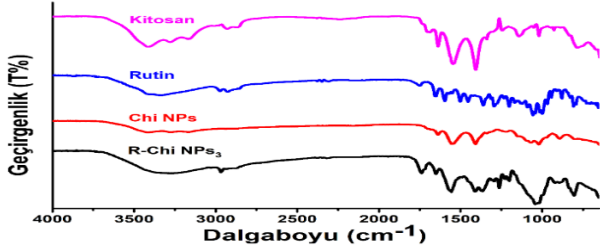
Tablo 1'de görüldüğü üzere üretilen boş Chi NPs'lerin ortalama boyut değerleri 183.2±0.36 nm, PDI değeri ise 0.245±0.005 olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar boş Chi NPs'lerin monodispers boyut dağılımında olduğunu göstermektedir. Rutin yüklü nanopartiküllere ait boyut analizi sonuçları incelendiğinde ise rutin yüklenmesi ile partiküllerin ortalama boyut değerlerinin arttığı ve 210.9±1.2- 244.4±3.69 nm aralığında olduğu gözlenmiştir. Üretilen rutin yüklü nanopartiküllerin PDI değerlerinin ise 0.256±0.008- 0.370±0.008 arasında değiştiği ve monodispers boyut dağılımında olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen enkapsülasyon etkinliği, rutin yükleme kapasitesi ve boyut dağılımları göz önüne alındığında R-Chi NPs₃ nanopartikülünün monodispers boyut dağılımında olduğu ve en yüksek rutin yükleme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle bundan sonraki ileri analiz (FT-IR, salım, antioksidan aktivite) çalışmaları R-Chi NPs₃ nanopartikülleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. FTIR Analizi

Üretilen R-Chi NPs₃, rutin, kitosan ve boş Chi NPs kullanılarak karşılaştırmalı FT-IR analizi yapılmış ve elde edilen spektrum Şekil 3'te verilmiştir. Rutin yüklü nanopartiküllerin FTIR spektrumunda, kitosana ait amid bağının yarılmış piki 1658 cm⁻¹'de, C-O gerilmesi ve O-H bağlanmasına ait pikler ise sırasıyla 1153 cm⁻¹, 3498 cm⁻¹'de gözlenmiştir (Lawrie ve ark. 2007; Qi ve ark. 2004). Rutin molekülünün IR spektrumu incelendiğinde 3600-3200 cm⁻¹ arasında kuvvetli OH gerilmesi, 1745 cm⁻¹'de C=O kuvvetli karbonil bandı ve 1200-1020 cm⁻¹ arasında ise kuvvetli C-O-C gerilmesine ait karakteristik pikler

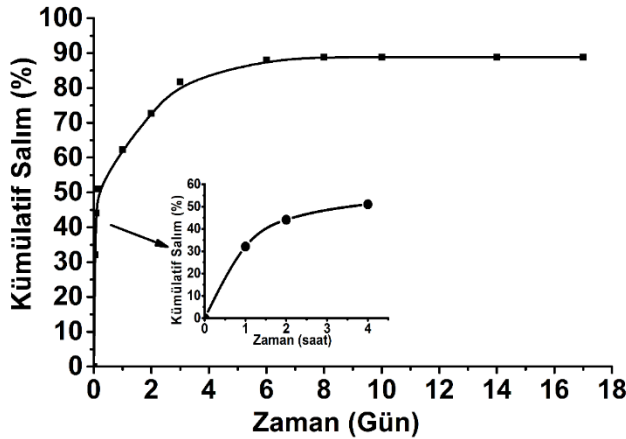
görülmektedir (Hooresfand ve ark. 2015). Rutin yüklü kitosan nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu incelendiğinde ise 1200-1260 cm^{-1} aralığında P=O bağına ait pik, 1200-1250 cm^{-1} aralığında ise C-O-C simetrik gerilimine ait pik görülmektedir. Nanopartiküllere ait spektrumda görülen pikler rutinün başarılı bir şekilde kitosan nanopartiküllerine yüklendiğini göstermektedir.



Şekil 3. Kitosan, Rutin, Chi NPs ve R-Chi NPs₃'e ait FTIR Spektrumu

3.5. R-Chi NPs₃ için In-vitro Salım

Rutin molekülünün *in-vitro* salım çalışması fosfat tamponunda (PBS, pH=7.4) 17 gün boyunca gerçekleştirilmiş ve elde edilen kümülatif salım grafiği Şekil 4'te verilmiştir. Kümülatif salım sonuçları incelendiğinde, 2. Saatte %44.12, 2. günde %72.7 ve 6. günün sonunda ise %85.2 oranında rutin salımı gerçekleştiği, daha sonrasında salım oranının azalarak kümülatif salımın sabitlenmeye başladığı görülmektedir. 17. günün sonunda ise %88.8 oranında rutin salındığı tespit edilmiştir.

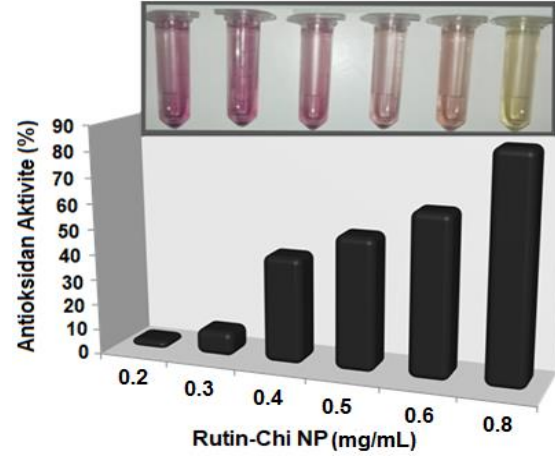


Şekil 4. R-Chi NPs₃'e Ait Kümülatif Salım Profili

3.6. Antioksidan Aktivite

R-Chi NPs₃ için yapılan antioksidan aktivite analizinde farklı konsantrasyonlarda (0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6 ve 0.8 mg/mL) R-Chi NPs₃ içeren çözeltilerin karşılaştırmalı olarak reaktif oksijen türevlerini süpürme yüzdeleri incelenmiş ve elde edilen antioksidan aktivite değerleri Şekil 5'te verilmiştir. Rutin yüklü nanopartikül konsantrasyonuna bağlı olarak rutin miktarı arttıkça

antioksidan aktivitenin de arttığı gözlenmiştir. En yüksek konsantrasyona sahip (0.8 mg/mL) R-Chi NPs₃ çözeltilinde antioksidan aktivite değeri %88.1 olarak bulunmuştur. Literatürde farklı konsantrasyonlarda serbest rutin molekülünün antioksidan aktivite değerleri 0.05 mg/ml için %11.6±2.1 ve 0.20 mg/ml için %26.2±1.8 olarak belirtilmiştir (Yang ve ark., 2008).



Şekil 5. Farklı Konsantrasyonlarda R-Chi NPs₃ İçeren Çözeltilere Ait Antioksidan Aktivite Grafiği

4. Sonuç

Bu çalışmada, antioksidan, antimikrobiyal ve şelatlayıcı özelliklere sahip olduğu bilinen ancak düşük biyoyararlanımı olan rutin molekülünün biyoyararlanımını arttırmak için iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak rutin yüklü kitosan nanopartikülleri sentezlenmiş ve fizikokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanopartiküller arasından %69.45 enkapsülasyon etkinliğine sahip 244.4±3.69 nm boyutlu (PDI=0.260±0.013) R-Chi NPs₃ optimum nanopartikül olarak belirlenmiştir. Optimum nanopartikülün *in vitro* ortamda % kümülatif salım değeri 17. günün sonunda %88.8 olarak belirlenmiştir. Aynı nanopartikül kullanılarak DPPH yöntemi ile gerçekleştirilen antioksidan aktivite sonucunda 0.8 mg/mL konsantrasyondaki R-Chi NPs₃ nanopartikül çözeltilinin %88.1 oranında antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Kontrollü salım yapabilecek, yüksek oranda etken molekül yükleme kapasitesine sahip sistemler hidrofobik moleküllerin ve özellikle flavonoidlerin taşınması için uzun zamandır araştırılan sistemlerdir. Bu sistemlerin tasarlanmasına yönelik çalışmalar, biyoyararlanımı düşük fakat organizma için faydalı olan flavonoidlerin etkilerini arttırmada kullanılarak özellikle fonksiyonel gıdaların ve ilaç/gıda takviyelerinin hazırlanmasında önemli birer basamak olacaktır.

Yazar katkıları:

Bu çalışmada; GB, deneysel çalışma, literatür araştırması ve yayın taslağının hazırlanması; ÖA, deneysel çalışma,

literatür araştırması ve yayın taslağının hazırlanması; DT, deneysel çalışma ve literatür araştırması; PPA, deneysel çalışma, analiz sonuçlarının yorumlanması ve yayın taslağının hazırlanması; KK, karakterizasyon sonuçlarının yorumlanması, grafik tasarımı, literatür araştırması ve yayının yazımı; SD, deneylerin tasarımı, araştırmanın yönlendirilmesi, sentez ve karakterizasyon analizlerinin sonuçlarının yorumlanması ve yayının yazımına katkı sağlamıştır.

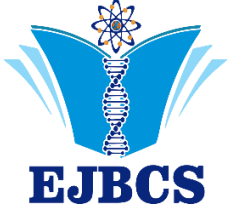
Çıkar çatışması bildirimi:

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

- Agrawal RD, Tatode AA, Rarokar NR, Umekar MJ. 2020. Polymeric micelle as a nanocarrier for delivery of therapeutic agents: A comprehensive review. *J Drug Deliv and Therapeutics*. 10(1-s): 191-195.
- Ananth DA, Rameshkumar A, Jeyadevi R, Jagadeeswari S, Nagarajan N, Renganathan R, Sivasudha T. 2015. Antibacterial potential of rutin conjugated with thioglycolic acid capped cadmium telluride quantum dots (TGA-CdTe QDs). *Spectrochim Acta A: Mol Biomol Spectrosc*. 138: 684-692.
- Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. 2012. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 81(3): 463-469.
- Bilia AR, Isacchi B, Righeschi C, Guccione C, Bergonzi MC. 2014. Flavonoids loaded in nanocarriers: an opportunity to increase oral bioavailability and bioefficacy. *Food and Nutr Sci*. 5(13): 1212-1227.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181(4617): 1199-1200.
- Budhian A, Siegel SJ, Winey KI. 2007. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *Int J Pharm*. 336(2): 367-375.
- Cun D, Jensen DK, Maltesen MJ, Bunker M, Whiteside P, Scurr D, Foged C, Nielsen HM. 2011. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization. *Eur J Pharm Biopharm*. 77(1): 26-35.
- Davidson RS, Kehoe G. 2015. Methods for modulating dissolution, bioavailability, bioequivalence and drug delivery profile of thin film drug delivery systems, controlled-release thin film dosage formats, and methods for their manufacture and use. US 8,999,372, 7Apr. 2015.
- De Queiroz Antonino RSC, Lia Fook BRP, De Oliveira Lima VA, De Farias Rached RÍ, Lima EPN, Da Silva Lima RJ, Peniche Covas CA, Lia Fook MV. 2017. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Mar Drugs*. 15(5): 141.
- Derman S. 2015. Caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles: effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size. *J Nanomater*. 10: 1-12.
- Derman S, Kızılbey K, Akdeste ZM. 2013. Polymeric nanoparticles. *Sigma*. 31: 107-120.
- Ertugen E, Tunçel A, Yurt F. 2020. Docetaxel loaded human serum albumin nanoparticles; synthesis, characterization, and potential of nuclear imaging of prostate cancer. *J Drug Deliv Sci and Technol*. 55: 101410.
- Frutos MJ, Rincón-Frutos L, Valero-Cases E. 2019. Rutin. In: Nabavi SM, Silva SA (ed) *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 1st edn. Academic Press, London.
- Graefe EU, Witting J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. 2001. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*. 41:492-499
- Hao S, Wang Y, Wang B, Deng J, Liu X, Liu J. 2013. Rapid preparation of pH-sensitive polymeric nanoparticle with high loading capacity using electrospray for oral drug delivery. *Mater Sci and Eng: C*. 33(8): 4562-4567.
- Hooresfand Z, Ghanbarzadeh S, Hamishehkar H. 2015. Preparation and characterization of rutin-loaded nanophytosomes. *Pharm Sci*. 21(3): 145-151.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci*. 96(3): 229-245.
- Kirik T, Kızılbey K. 2019. Rutin yüklü PLGA nanopartiküller; farklı yöntemler kullanılarak sentezi ve karakterizasyonu. *Iğdır Üniv Fen Bil Enst Dergisi*. 9(2): 922-932.
- Kızılbey K. 2019. Optimization of Rutin-loaded PLGA nanoparticles synthesized by single-emulsion solvent evaporation method. *ACS Omega* 4(1): 555-562.
- Kreft I, Fabjan N, Yasumoto K. 2006. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chem*. 98(3): 508-512.
- Kumar A, Mansour HM, Friedman A, Blough ER. 2013. *Nanomedicine in Drug Deliv*. CRC Press. Florida.
- Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, Grøndahl L. 2007. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 8(8): 2533-2541.
- Nagarwal RC, Kant S, Singh P, Maiti P, Pandit J. 2009. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. *J Controlled Release*. 136(1): 2-13.
- Nguyen TA, Liu B, Zhao J, Thomas DS, Hook JM. 2013. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chem*. 136(1): 186-192.
- Peniche H, Peniche C. 2011. Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polym Int*. 60(6): 883-889.
- Pilorget A, Berthet V, Luis J, Moghrabi A, Annabi B, Béliveau R. 2003. Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-) epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem*. 90(4): 745-755.

- Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res.* 339(16): 2693-2700.
- Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. 2013. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs.* 22(8): 1063-1079.
- Sun W, Mao S, Wang Y, Junyaprasert VB, Zhang T, Na L, Wang J. 2010. Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *Int J Pharm.* 386(1-2): 275-281.
- Yang J, Guo J, Yuan J. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT.* 41(8): 1060-1066
- Yeo Y, Park K. 2004. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res.* 27(1): 1.
- Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, AbuBakar S. 2011. In vitro antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against dengue virus type-2. *J Med Plants Res.* 5(23): 5534-5539.



Vitreoscilla hemoglobin geni aktarılmış *Erwinia herbicola*'da indol-3-asetik asit (IAA) üretimi

Aslı Giray^{1*}, Hikmet Geçkil²

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Alanya, Türkiye

²İnönü Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Malatya, Türkiye

*Corresponding author : asli.giray@alanya.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-5374-3727>

Received : 06/05/2020
Accepted : 24/12/2020

Abstract: Indole-3-acetic acid (IAA) is an important natural auxin hormone found in plants. IAA biosynthesis is a common condition among plant-related bacteria and there are different biosynthetic ways to produce this hormone. In this study was investigated the production of IAA in *E. herbicola* carrying the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) gene. The effect of endogenous recombinant oxygen intake system on the production of IAA was studied for the first time. The production of IAA in the recombinant strain carrying the VHb gene (vgb+) in rich and poor medium was noted to be higher than in the wild and vgb- control strains. The recombinant strains had significantly higher oxygen uptake than the host. The highest IAA level was observed in the stationary phase cultures rich in L-tryptophan.

Keywords: *Erwinia herbicola*, *Vitreoscilla* hemoglobin, Indol-3-acetic acid (IAA), recombinant DNA technology

Production of indole-3-acetic acid (IAA) using Erwinia herbicola with vitreoscilla hemoglobin gene transferred

Özet: İndol-3-asetik asit (IAA) bitkilerde bulunan önemli bir doğal oksin hormonudur. IAA biyosentezi, bitki ile ilişkili bakteriler arasında yaygın bulunan bir durum olup, bu hormonun üretimi için farklı biyosentetik yollar bulunmaktadır. Bu çalışmada, *Vitreoscilla* hemoglobinin (VHb) geni taşıyan rekombinat *Erwinia herbicola*'da IAA üretimi araştırılmıştır. *E. herbicola*'da bu şekilde endojen rekombinant bir oksijen alım sisteminin IAA üzerindeki etkisi ilk defa çalışılmıştır. VHb geni (vgb+) taşıyan rekombinant suşun zengin ve minimal besiyelerinde ürettiği IAA seviyelerinin yabancıl ve vgb- kontrol suşularından daha yüksek olduğu kaydedildi. Rekombinant suşların konakçıdan önemli derecede yüksek oksijen alımına sahip oldukları belirlendi. En yüksek IAA'nın seviyesi geç kültür fazında L-triptofan içeren kültürlerde saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Erwinia herbicola*, *Vitreoscilla* hemoglobini, Indol-3-asetik asit (IAA), rekombinant DNA teknolojisi

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Erwinia herbicola* patojen olmayan, bitkilerin hava ile temas eden yüzeylerinde bulunan gram negatif bir bakteridir (Giddens ve ark., 2003; Handelsman ve ark., 1985; Spaepen ve ark., 2007). Ana metabolizması diğer birçok bakteriye benzese de, kendine özgü metabolik yolları ile L-DOPA, çeşitli antibiyotikler ve karotenoidler gibi çeşitli endüstrilerde kullanımı bulunan ürünleri sekonder metabolizmasının bir parçası olarak sentezleyen nadir bakterilerden biridir (Anderson ve ark., 1985; Koul ve ark., 1995). Bakterinin

diğer bir özelliği de önemli bir fitohormon olan indolasetik asiti (IAA, bir çeşit oksin) üretme özelliğidir (Spaepen ve ark., 2007; Brandl ve ark., 1996; Brandl ve Lindow, 1997; Brandl ve Lindow, 1998). IAA, bitki büyümesini teşvik eden bir hormon olup, sürekli üretimi oldukça önemlidir (Ozdal ve ark., 2017). Bakterinin bu hormonu, bitkinin mikrobiyal savunma stratejisini bypass etmek için kullandığı ileri sürülmekle birlikte, IAA'nın bir sinyal molekülü olarak davrandığı ve bakteri fizyolojisi üzerinde doğrudan etkili olduğu sanılmaktadır (Brandl ve ark., 1996; Spaepen ve ark., 2007). Günümüzde sadece yüksek

organizasyonlu bitkilerin değil fungusların, likenlerin, alglerin ve bakterilerin de indol-3-asetik asit (IAA) oluşturdukları saptanmıştır (Stijn ve ark., 2000). Toprak mikroflorası içinde yer alan pek çok mikroorganizma IAA oluşturma yeteneğine sahiptir. Bakteriler IAA'yı bitki dokularında proliferasyonu uyarmak için kendilerinin kolonizasyon stratejilerinin bir parçası olarak kullanırlar. Bitki savunması ve oksin sinyalleri arasındaki bağlantı, kolonizasyonda bakteriyel IAA'nın rolüne ekstra bir boyut kazandırmaktadır (Manulis ve ark., 1998). *E. herbicola*'da IAA biyosentezinde, ortamdaki bakteri yoğunluğu ve quorum-sensing (QS) sinyal molekülleri arasında önemli bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (Gurel ve Serbetci, 2009). IAA üreten bakteri ve bitkiler arasındaki etkileşimler bitki lehinde olan bir durumdur ve patojenezden fitostimülasyona kadar çeşitli sonuçlara yol açmaktadır. Bakteriyel IAA sentezinde triptofan temel bir öncüdür. IAA üretimi için öncül olarak triptofanın kullanıldığı beş farklı biyosentez yolu bulunmaktadır: İndol-3-asetamid (IAM) yolu, indol-3-pirüvat (IPyA) yolu, triptamin (TAM) yolu, triptofan yan zincir oksidaz yolu (TSO), indol-3-asetonitril (IAN) yolu (Stijn ve ark., 2000; Ozdal ve ark., 2017). *E. herbicola* IAA üretiminde indol-3-asetamid (IAM) ve indol-3-pirüvat (IPyA) yolunu kullanmaktadır (Stijn ve ark., 2000).

Bu çalışmada VHB/vgb sisteminin IAA üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *Vitreoscilla* hemoglobini (VHB), bakteriyel orjinli bir hemoglobindir (Wakabayashi ve ark., 1986; Dikshit ve ark., 1988; Khosla ve Biley, 1989; Kroneck ve ark., 1991; Strohl ve ark., 1986). Bu proteinin esas fonksiyonunun düşük konsantrasyonlarda bulunan ekstraselüler oksijeni bağlayarak onu terminal solunum oksidazlarına vermek ve böylece hipoksik şartlarda hücre solunuma katkıda bulunduğu sanılmaktadır (Dikshit ve ark., 1988). *vgb* geni oksijenle negatif regüle olan bir promotora sahip olup, oksijen seviyesinin düşük olduğu (yaklaşık %2 O₂ içeren) ortamlarda genin ekspresyon düzeyi 50 kate varan oranlarda artmaktadır (Dikshit ve ark., 1989). Bu şartlarda, *vgb* rekombinant bakterilerinin oksijen alım seviyelerinin 5-10 kat arttığı rapor edilmiştir. *Vitreoscilla* hemoglobininin (VHB) ifade edildiği çeşitli rekombinant mikroorganizmalarda kontrollü bir oksijen alım ve salınımı sağlayarak yapımları bu şekilde mikroaerofilik bir ortam gerektiren ürünlerin sentezinde avantaj sağladığı bilinmektedir (Ates ve ark., 2006; Zelasco ve ark., 2006). Bu çalışmada, VHB/*vgb* sisteminin IAA üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunun için, *Erwinia herbicola* ve onun *Vitreoscilla* hemoglobini (VHB) geni klonlanmış suşu (*vgb*⁺) ile *vgb* içermeyen (*vgb*⁻) rekombinant suşları kullanılmıştır.

2. Materyal ve Method

2.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar, Ayraçlar ve Besiyerleri

Bu çalışmada kültürlerin yapıldığı besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar; plazmid izolasyonu, agaroz jel elektroforezi uygulamalarında kullanılan kimyasallar ve çeşitli tamponların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar, antibiyotiklerin analizi için gerekli kimyasallar ve standartlar, Salkowsky Ayırıcı kimyasalları olan H₂SO₄ ve FeCl₃ analitik saflık

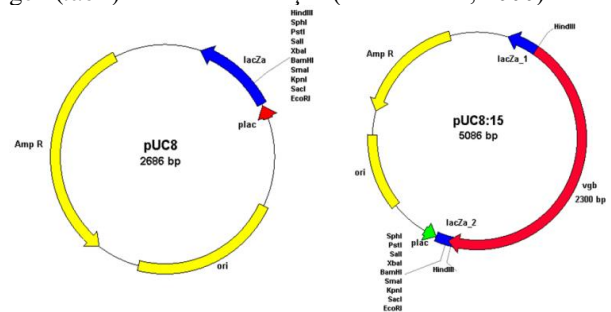
derecesinde olup Sigma şirketinden temin edildi. Bu çalışmada zengin besiyeri olarak Luria-Bertani (LB) (pH 7.0) besi ortamı kullanılırken, minimal besiyeri ortamı olarak sınırlı bir besinsel içeriğe sahip olan M9 kullanıldı. M9 ortamları düşük (%0.1) ve yüksek (%1) konsantrasyonda farklı karbon kaynağı (glukoz, fruktoz ve sükröz) ile desteklendi. Ayrıca M9 ortamlarında inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi.

2.2. Kullanılan Bakteriler

Erwinia herbicola (NRRL B-3466), Amerikan Tarım Bakanlığı Kültür Koleksiyonundan (USDA Culture Collection, Peoria, Illinois, USA) bakteri stok kültürlerinden sorumlu küratör Dr. Alejandro Rooney tarafından sterilize vakumlanmış ampüller içinde toz kültür olarak tarafımıza sağlanmıştır. *Erwinia herbicola*'nın *Vitreoscilla* hemoglobin geni (*vgb*) klonlanmış rekombinantı (*E. herbicola* [pUC8:15]) ve kontrol olarak da *vgb* rekombinant suşu (*E. herbicola* [pUC8]) tarafımızdan oluşturuldu.

2.3. *vgb* Klonları

Bu çalışmada kullanılan *E. herbicola*'nın *vgb*⁺ rekombinantı *vgb* genini bir pUC plazmidi üzerinde taşıırken, *vgb*⁻ rekombinantı *vgb* geniden yoksun olan pUC plazmidini taşımaktadır (Şekil 1). *E. herbicola*'nın *vgb*⁺ rekombinantının grafiklerdeki gösterimi "Eh[pUC8:15]" olarak verilirken, *vgb*⁻ rekombinantı "Eh[pUC8]" şeklinde verilmiştir. pUC8 plazmidi yaklaşık 2.7 kb büyüklüğünde olup işlevsel bir *lacZ* geni taşıırken, yaklaşık 5 kb büyüklüğünde olan pUC8:15 plazmidinde *lacZ* geninin okuma çerçevesi içinde bulunan multi klonlama bölgesine 2.3 kb uzunluğundaki işlevsel *vgb* geni yerleştirilerek bu gen (*lacZ*) deaktive edilmiştir (Kurt ve ark., 2000).



Şekil 1. pUC8 ve pUC8:15 plazmidlerinin fiziki haritası

2.4. *E. herbicola*'nın genetik manipülasyonu

Çalışmada plazmid izolasyonu ve restriksiyon haritalaması için standart protokoller kullanıldı. *E. herbicola*'nın *vgb* klonlanmış rekombinant suşlarından plazmidler izole edildi. Plazmidlerin restriksiyon haritalarından bu vektörlerin istenen vektörler olup olmadığı araştırıldı. Bu transformantlardan elde edilen plazmidlerin minipreplerinden onların uygun plazmidini içerdikleri kanıtlandı.

2.5. Plazmid izolasyonu

Kültürü yapılan *E. herbicola*'nın *vgb*⁺ ve *vgb*⁻ rekombinantlarından plazmid izolasyonu standart alkali-lizis yöntemi kullanılarak yapıldı (Armstrong, 1983; Kurt

ve ark., 2000). Bu yöntemle yaklaşık 1 µg plazmid DNA'sı ile 5.10^6 - 2.10^7 transformant elde edilebildiği saptanmıştır. Gece boyunca inkübasyonu yapılan kültürlerden 1.5 ml alınıp 10,000 rpm'de 3 dak santrifüj edildi. Pelet 100 µl soğuk *Çözelti I* (GTE) ile sulandırılıp 30 san vortekslenildi ve 5 dak oda sıcaklığında bekletildi. Taze olarak hazırlanmış 200 µl *Çözelti II* (NaOH/SDS) eklenip tüp alt-üst edildikten sonra 5 dak buz içinde bekletildi. Karışıma 150 µl oda sıcaklığındaki *Çözelti III* (potasyum asetat) eklendi ve tekrar vortekslenip 5 dak buzda bekletildi. Karışım 10,000 rpm'de +4 °C'de 3 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve 0.8 ml % 95 etanol eklenerek 2 dak oda sıcaklığında bekletildi ve santrifüj edildi. Peletin üzerine 1 ml % 70 etanol eklendi, sonra tekrar santrifüj edildi ve pelet inkübatörde 37 °C'de yarım saat kurumaya bırakıldı. Pelete 30 µl steril TE tamponu eklendi (Armstrong, 1983; Kurt ve ark., 2000).

2.6. Plazmid miniprepleri

HindIII restriksiyon enzimi ile muamele edilerek kesilen yukarıdaki plazmidlerin restriksiyon haritaları agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. Jellerin hazırlanmasında ve yürütülmesinde 50X stok TAE tamponu kullanıldı. Agarozun jeldeki konsantrasyonu % 1.25 (w/v) olarak hazırlandı. Restriksiyon enzimi ile muamele görmüş plazmid DNA'sı ve HindIII restriksiyon enzimi ile önceden kesilmiş ve standart markır olarak kullanılan lambda (λ) DNA'sı uygun kuyucuklara yüklenerek jel elektroforezi sabit voltajda (70 Volt) 2 saat yürütüldü. Jeldeki DNA bantlaşma motifi UV ışık altında floresan ışık yayan etidyum bromür ile belirlendi ve elektroforetogramları yapıldı. Plazmidlerin restriksiyon bantlaşmasından istediğimiz DNA fragmanlarının bulunup bulunmadığı λ DNA'sının bilinen fragmanları ile oluşturulan standart eğriler yardımı ile tespit edildi (Armstrong, 1983; Kurt ve ark., 2000).

2.7. IAA üretimi

IAA'nın bakteriyel üretimi için zengin bir besiyeri olan LB (pH 7.0) ile bu ortamın % 0.1 ve % 0.5 triptofan (Mannulis ve ark., 1991) içeren formları kullanıldı. Ayrıca % 0.1 (düşük) ve % 1 (yüksek) konsantrasyonda farklı karbon kaynağının (glukoz, fruktoz ve sükroz) bulunduğu ve M9 ortamı kullanıldı. Kültürler belli zaman sürelerince inkübe edildikten sonra 1.5 ml'si santrifüj tüplerine transfer edildi ve 14,000 rpm'de +4 °C'de 5 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen supernatantlardan 1'er ml alındı ve alüminyum folyo ile kaplanmış Eppendorf tüplerine konularak IAA tayini için spektrofotometrik ölçüm yapılana kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Vasanthakumar ve McManus 2004).

2.8. IAA Tayini

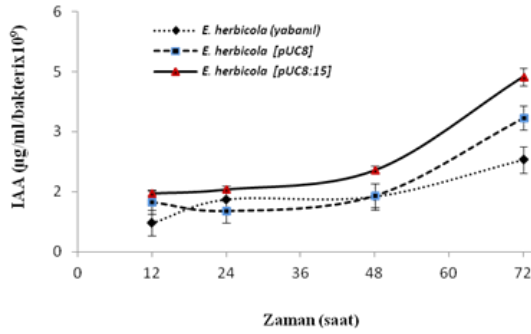
IAA'nın belirlenmesi yaygın olarak kullanılan Salkowsky reaksiyonu ile yapıldı. Salkowsky ayırıcı 150 ml konsantre H₂SO₄, 250 ml distile su ve 7.5 ml 0.5 M FeCl₃ solüsyonlarından oluşmaktadır (Vasanthakumar ve McManus 2004; Leveau ve Lindow, 2005). IAA tayini için, süpernatandan 1 ml alınarak üzerine 2 ml Salkowsky ayırıcı ilave edildi. Elde edilen karışım oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda oluşan renk yoğunluğu değerleri o renge özgü olan 530 nm dalga boyunda köre karşı okunarak kayıt edildi. Her kültür

ortamındaki IAA konsantrasyonu, daha önce sentetik IAA ile hazırlanan standart eğri yardımı sayesinde hesaplandı. Bu metodla IAA belirleme alt sınırının yaklaşık 5 µg/ml olarak saptanmıştır (Leveau ve Lindow, 2005).

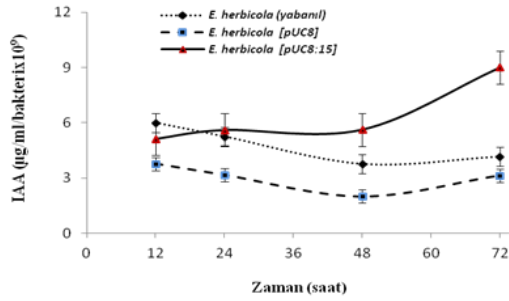
3. Bulgular

E. herbicola ve rekombinantlarının (*vgb*⁺ ve *vgb*⁻) IAA üretim karakteristikleri araştırıldı. Hücre kültürleri zengin bir besiyeri olan LB ortamı ile aynı ortamın % 0.1 ve % 0.5 triptofan ile desteklenerek yapıldı. LB ortamında her üç suşun zamana bağlı olarak artan IAA üretim profili Şekil 2'de görülmektedir. IAA seviyesinin ilk örneklerin alındığı 12 saat kültürlerinde, son örneklerin alındığı 72 saat kültürlerine kadar tedricen arttığı belirlendi. Tüm inkübasyon periyotlarında *Vitreoscilla* hemoglobin genini (*vgb*) taşıyan suşun (*vgb*⁺), diğer iki suşa (konakçı ve *vgb*⁻) göre genel olarak daha yüksek bir IAA seviyesine sahip olduğu saptandı. Bu farkın, ileri kültür fazlarında daha büyük olduğu ve özellikle 72 saat kültürlerinde *vgb*⁺ suşunun IAA seviyesinin, konakçı ve *vgb*⁻ suşlarından sırası ile yaklaşık 2 ve 1.3 kat fazla olduğu belirlendi. L-triptofanın, IAA oluşumunda öncül olması ve IAA biyosentezinde rol oynayan enzim sistemlerini indüklemesi sebebiyle LB besiyerlerine bu amino asitin L-formu düşük (% 0.1) ve yüksek konsantrasyonda (% 0.5) eklenmiştir. Kültürlere % 0.1 oranında triptofan eklenmesinin IAA üzerindeki indükleyici etkisi sadece *vgb*⁺ suşunda görüldü. Bu suşta IAA üretiminde zamana bağlı bir artış gözlenirken, en yüksek IAA seviyesinin kaydedildiği 72 saat kültürlerinde başlangıç (12 saat) kültürüne göre yaklaşık 2 kat artış belirlendi. Diğer iki suşta ise tersine IAA üretiminde genel olarak zamana bağlı bir düşüş gözlemlendi (Şekil 3). Tüm kültür periyotlarında *vgb*⁺ suşunun diğer iki suşa göre yaklaşık 3 kata varan yüksek IAA seviyelerine sahip olduğu belirlendi. Triptofanın % 0.5 oranında kullanıldığı kültürlerde ise bu amino asitin etkisi *vgb*⁺ suşu dahil her üç suşta da IAA üretimini baskılayıcı rol oynamıştır (Şekil 4). Bu ortamda konakçı canlı hücre sayısı özellikle 12 ve 24 saat kültürlerinde daha yüksek bulunurken, en düşük hücre yoğunluğu tüm kültür fazlarında *vgb*⁻ suşunda gözlemlendi. Kültür pH'larındaki değişim, en açık şekilde pH değeri 7.0 olan başlangıç kültürlerinin pH değeri 8'lerin üzerine çıktığı 12 saat kültürlerinde görüldü ve bu kültür fazından sonra pH değerlerinde çok az bir artış kaydedildi. Glukoz içeren ortamlarda, konakçı hücre kültürleri hariç, glukozun farklı konsantrasyonları IAA üretimi üzerinde oldukça farklı etki gösterdi. Özellikle *vgb*⁺ suşunda % 1 glukoz içeren M9 ortamında, % 0.1 glukoz içeren ortama göre 8 kat IAA artışı gözlemlendi (Şekil 5). Canlı hücre sayısı konakçı hücre kültürlerinde diğer iki suşa göre yaklaşık 5 kata varan oranlarda yüksek bulundu. Yüksek glukoz konsantrasyonu rekombinantların hücre sayısı üzerinde negatif bir etki yarattığı görüldü. Kültür ortamına fruktozun eklenmesi, konakçı ile rekombinantlar üzerinde farklı etki ile kendini gösterdi. Konakçı hücrede IAA seviyesi yüksek fruktoz ortamında düşük fruktoz ortamına göre yaklaşık 5 kat yüksek belirlendi. *vgb*⁻ ve *vgb*⁺ suşlarında ise, yüksek fruktoz ortamında IAA seviyesinde sırası ile 2.3 ve 2 kat azaldığı saptandı (Şekil 6). Sükrozu % 0.1 oranında içeren

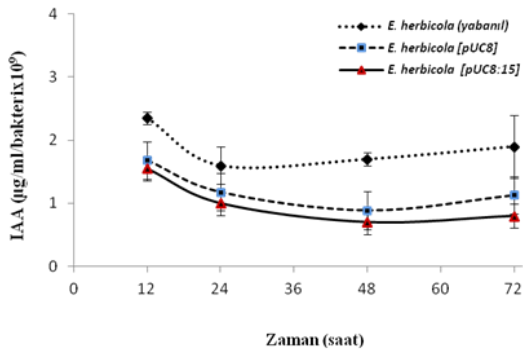
ortam ile kıyaslandığında, % 1 sükröz içeren ortamda IAA seviyesi konakçı, *vgb⁻* ve *vgb⁺* suşlarında sırası ile 3.5, 1.8 ve 5 kat daha fazla olduğu tespit edildi. En yüksek IAA seviyesi, *vgb⁻* suşunda görülürken, *vgb⁺* suşunun nispeten düşük bir IAA düzeyine sahip olduğu belirlendi (Şekil 7).



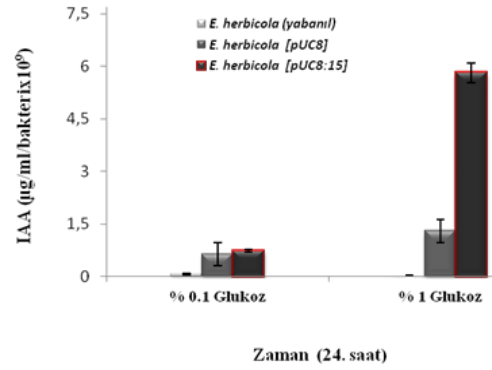
Şekil 2. LB ortamında IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



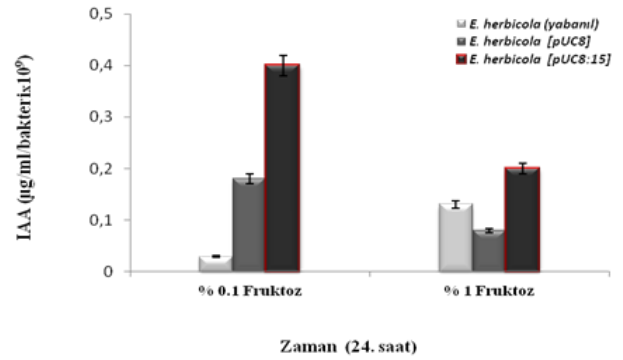
Şekil 3. Triptofan destekli LB ortamında IAA üretimi. Triptofan kültür ortamına 6. saatte % 0.1 oranında eklenmiştir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



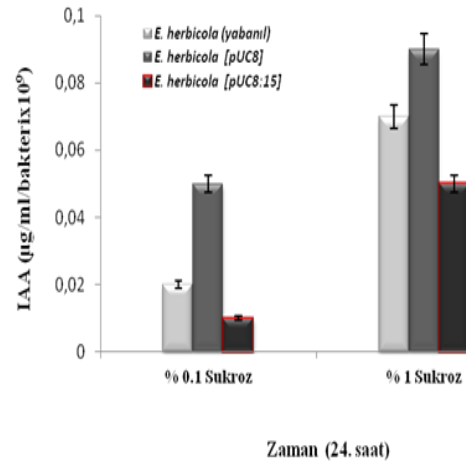
Şekil 4. Triptofan destekli LB ortamında IAA üretimi. Triptofan kültür ortamına 6. saatte % 0.5 oranında eklenmiştir. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



Şekil 5. Glukoz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



Şekil 6. Fruktozla desteklenmiş M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.



Şekil 7. Sükröz destekli M9 ortamında 24 saat kültürlerinde IAA üretimi. Her veri noktası üç bağımsız deneyin ortalaması olup, hata çubukları standart hataları (σ_{n-1}) ifade etmektedir.

4. Tartışma

IAA'in VHB/vgb sistemini içeren rekombinant mikroorganizmalar kullanılarak üretimi ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. LB ortamında vgb⁺ rekombinantının genel olarak diğer her iki suştan da yüksek IAA seviyelerine sahip olduğu belirlendi. L-triptofanın, IAA oluşumunda öncül olup, IAA biyosentezinde rol oynayan enzim sistemlerini indüklediği bilinmektedir. Bu nedenle, L-triptofanın IAA üretimindeki rolünü orataya koymak amacıyla LB ortamına bu amino asitin hem düşük (%0.1) hemde yüksek konsantrasyonda (%0.5) eklenmiştir. Düşük triptofan ortamında IAA üretiminde her üç suşta da genel bir artış görülürken, vgb⁺ rekombinantında kültür boyunca diğer iki suşa göre daha yüksek IAA üretimi sergilediği görülmüştür. LB ve düşük triptofan ortamlarında vgb⁺ suşunda IAA üretiminin özellikle 72 saat kültürlerinde diğer iki suşa göre yüksek olması, ortam oksijeni ile regüle olan böyle bir metabolitin yine hücrelere yüksek bir oksijen alım kapasitesi sunan VHB/vgb sisteminden pozitif yönde etkilendiği görülmüştür. Düşük triptofan ortamında, özellikle kültürün ilerleyen fazlarında düşük bir hücre yoğunluğu ile kendini gösteren vgb⁺ rekombinantının, yüksek IAA üretimi sergilemesi, hücre yoğunluğu ile IAA üretimi arasında önemli bir korelasyon olabileceğini işaret etmektedir. Ancak tersine, yüksek triptofan ortamında bu vgb⁺ rekombinantında IAA üretiminin oldukça baskılandığı görülmüştür. Bakteriyel IAA sentezinde triptofanın temel bir öncül olmasına rağmen, bu amino asitin yüksek konsantrasyonlarının IAA üretimini baskılamasının nedeni, ortamdaki IAM birikiminin L-triptofan ↔ IAM dönüşümünü katalizleyen enzim sistemini inhibe etmesi olabilir.

Mikroorganizmaların besinsel ve çevresel ihtiyaçlarının belirlenmesi biyoproses çalışmaları için en önemli adımı oluşturmaktadır. Bu çalışmada, düşük ve yüksek konsantrasyonda glukoz, fruktoz ve sükrozun, IAA üretimini farklı düzeylerde etkilediği görülmüştür. Gerek düşük gerekse yüksek konsantrasyonda glukoz ve fruktoz ortamında vgb⁺ rekombinantı konakçıya göre daha yüksek IAA üretimi sergilerken, sükroz ortamında tersi bir durum sergilediği gözlenmiştir. Farklı kültür koşullarında vgb⁺ rekombinant suşunda en fazla IAA üretiminin görüldüğü ortam yüksek konsantrasyonlu glukoz ortamı olmuştur. vgb⁺ suşundaki bu üretimin fruktoz ortamına göre 30 kat; sükroz ortamına göre 116 kat ve LB ortamına göre ise yaklaşık 6 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak vgb⁺ rekombinant suşunda IAA üretimi için en ideal karbon kaynağının glukoz olduğunu söylemek mümkündür. Yapılan bir çalışmada, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı M9 ortamında kültürü yapılan hücrelerde IAA üretiminin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Yürekli ve ark., 2003). Bu durum, bizim çalışmamızdaki bulgular ile örtüşmektedir.

5. Sonuç

Bu çalışmada *E. herbicola*, bu bakterinin pUC8 plazmid taşıyan (Eh[pUC8]) ve aynı plazmid üzerinde vgb geni taşıyan (Eh[pUC8:15]) rekombinant suşlarının IAA üretim karakteristikleri çalışıldı. VHB/vgb sisteminin, ortam

oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında oksijeni membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği kazandırarak özellikle ikincil metabolit üretiminde yardımcı olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2009; Holmberg ve ark., 1997). Bu çalışma sonuçları göstermiştir ki, aktarılmış olduğu hücrelere etkin bir oksijen alım yeteneği kazandıran VHB'nin *E. herbicola*'da sekonder metabolitlerin sentezini kullanılan karbon kaynağı ya da besi ortamına bağlı olarak ya baskınladığı ya da indüklediği görülmüştür. VHB ile sağlanan fazla oksijen bazı durumlarda bakteride metabolit üretimi için bir dezavantaj yaratıp metabolit sentezini baskımlarken, bazı durumlarda ise daha yüksek metabolit sentezinin gerçekleşmesine imkan tanımıştır. *E. herbicola*'da metabolik akış profilinin farklı şekillerde regüle olması, bu bakteride karbon akışının regülasyonunun ve indükleyici kontrolün farklı olmasından kaynaklanabilir.

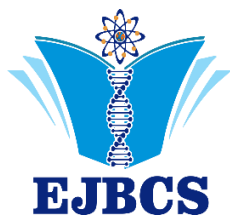
Teşekkür

2011/10 nolu proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve vermiş olduğu her türlü desteğinden dolayı Doktora Tez Danışmanım Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL'e teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Armstrong KA. 1983. Molecular cloning a laboratory manual maniatıs. Q Rev Biol. 58(2):234-234.
- Ates B, Gencer S, Ozalp Erenler S, Geçkil H. 2006. Production of L-asparaginase, a chemotherapeutic enzyme, in bacteria expressing Vitreoscilla hemoglobin. Febs J. 273:139-139.
- Brandl M, Clark EM, Lindow SE. 1996. Characterization of the indole-3 acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. Can J Microbiol. 42(6):586-592.
- Brandl MT, Lindow SE. 1997. Environmental signals modulate the expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. Mol Plant Microbe In 10(4):499-505
- Brandl MT, Lindow S. 1998. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. Appl Environ Microbio. 64(9):3256-3263.
- Dikshit KL, Webster DA. 1988. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from vitreoscilla in *Escherichia coli*. Gen. 70(2):377-386.
- Dikshit KL, Spaulding D, Braun A, Webster DA. 1989. Oxygen inhibition of globin gene-transcription and bacterial hemoglobin-synthesis in Vitreoscilla. J Gen Microbiol. 135:2601-2609.
- Giddens SR, Houliston GJ, Mahanty HK. 2003. The influence of antibiotic production and pre-emptive colonization on the population dynamics of *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) Eh1087 and *Erwinia amylovora* in plant. Environ Microbiol. 5(10):1016-1021.
- Gurel F, Serbetci T. 2009. Production of n-(3-oxo-hexanoyl)-l-homoserine lactones (ohhl) responsible for "quorum-sensing" In *Pseudomonas syringae* Pv. Savastanoi. Turk Microbiol Soc. 39(3):58-61.
- Handelsman J, Brill WJ. 1985. *Erwinia herbicola* isolates from alfalfa plants may play a role in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Appl Environ Microbiol. 49(4):818-821.

- Holmberg N, Lilius G, James E, Bailey B, Leif B. 1997. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nat Biotech.* 15(3):244-247.
- Khosla C, Bailey J. 1989. Characterization of the oxygen dependent promoter of the *Vitreoscilla* Hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 171(11):5995-6004.
- Koul S, Johri S, Verma V, Nabi Qazi G. 1995. Physical characterization of a glucose dehydrogenase-bearing plasmid from ketoacid-producing *Erwinia herbicola*. *World J Microb Biot.* 11(2):234-235.
- Kroneck PMH, Jakob W, Webster DA, DeMaio R. 1991. Studies on the bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*-redox properties and spectroscopic characterization of the different forms of the hemoprotein. *Biol Met.* 4(2):119-125.
- Kurt AG, Aytan E, Ozer U, Ates B, Geçkil H. 2009. Production of L-DOPA and dopamine in bacteria bearing *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Biotech J.* 4(7):1077-1088.
- Leveau JHJ, Lindow SE. 2005. Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain. *Appl Environ Microbiol.* 71(5):2365-2371.
- Manulis S, Gafni Y, Clark E, Zutra D, Ophir Y, Barash I. 1991. Identification of a plasmid DNA probe for detection of strains of *Erwinia herbicola* pathogenic on *Gypsophila paniculata*. *Phytopathol.* 81(1):54-57.
- Manulis S, Chesner AH, Brandl MT, Lindow SE, Barash I. 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Mol Plant Microbe In.* 11(7):634-642.
- Ozdam M, Ozdam OG, Sezen A, Algur OF, Kurbanoglu EB. 2017. Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *Biotech.* 7:23.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Fems Microbiol Rev.* 31(4):425-448.
- Stijn S, Jos V, Roseline R. 2000. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Fems Microbiol Rev.* 1-24.
- Strohl WR, Schmidt TM, Lawry NH, Mezzino MJ, Larkin JM. 1986. Characterization of *Vitreoscilla*-*Beggiatoidea* and *Vitreoscilla*-*Filiformis* and comparison with *Vitreoscilla*-*Stercoraria* and *Beggiatoa*-*Alba*. *Int J Syst Bacteriol.* 36(2):302-313.
- Vasanthakumar A, McManus PS. 2004. Indole-3-acetic acid-producing bacteria are associated with cranberry stem gall. *Phytopathol.* 94(11): 164-1171.
- Yurekli F, Geçkil H, Topcuoglu F. 2003. The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus *Lentinus sajor-caju* under different culture conditions. *Mycol. Res.* 107(3): 305-309.
- Zelasco S, Reggi S, Calligari P, Balestrazzi A, Bongiorno C, Quattrini E, Delial G, Bisoffi S, Fogher C, Confalonieri M. 2006. Expression of the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb)-Encoding gene in transgenic white poplar: plant growth and biomass production, biochemical characterization and cell survival under submergence, oxidative and nitrosative stress conditions. *Mol Breed.* 17(3):201-216.
- Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA. 1986. Primary Sequence of a Dimeric Bacterial Hemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nat.* 322(6078):481-483.
- Wang ZN, Xiao Y, Wansheng C, Tanga K, Zhang L. 2009. Functional expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) in *Arabidopsis* relieves submergence, nitrosative, photo-oxidative stress and enhances antioxidants metabolism. *Plant Sci.* 176(1): 66-77.



Multiple shoot induction and plant regeneration of *Staurogyne repens* (Nees) Kuntze

Merve Sifa Hane Kose¹, Muhammet Dogan², Gökhan Sadi^{1*}

¹Karamanoğlu Mehmetbey University, Kamil Ozdag Faculty of Science, Department of Biology, Karaman, Turkey.

²Karamanoğlu Mehmetbey University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Karaman, Turkey.

*Corresponding author : sadi@kmu.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-6422-1203>

Received : 03/05/2020
Accepted : 19/11/2020

Abstract: *Staurogyne repens* (Nees) Kuntze is an aquatic plant belonging to Acanthaceae family. It is a valuable plant in the aquarium industry. Therefore, there has been a significant demand for this plant. This study was designed for multiple and efficient productions of *S. repens* under *in vitro* conditions. He used nodal meristems as the type of explant. Nodal meristems were preferred as explant type. The explants were transferred to Murashige and Skoog (MS) food media with TDZ single (0-1.50 mg/L) and TDZ (0.25-1.50 mg/L) + IAA (0.25 mg/L) combinations. In TDZ application, the most number of shoots per explant (15.36 shoots/explants) was recorded in cultures with 1.50 mg/L TDZ, while in TDZ + IAA application, the most number of shoots (9.44 shoots/explants) was determined in culture with 1.0 mg/L TDZ + 0.25 mg/L IAA. In general, shoot lengths in TDZ + IAA combination was measured higher than the single application of TDZ. The longest shoot (1.67 cm) was obtained in the culture medium with 1.0 mg/L TDZ + 0.25 mg/L IAA. The extended shoots were transposed to rooting media with 0.25 mg/L IAA, and multiple root formations were determined after four weeks. The rooted plants were transferred to the aquarium and successfully accustomed to *ex vitro* conditions.

Keywords: Acclimatization, propagation, shoot regeneration, tissue culture

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

In vitro methods have been increasingly used since the 1960s for the development and production of plants. Plant tissue cultures studies have focused on cell biology, plant development, disease-free plant production, micropropagation and secondary metabolites (Gaspar et al. 1996; Efferth 2019). The propagation method applied to study cells, tissues and organs is a technique in which growth modifiers play an active role (Mahna et al. 2013; Pandey and Pandey 2018). Genetically engineered plants are obtained using tissue culture and techniques (Mineo 1990; El-Sherif 2018; Altman 2019).

Plant tissue culture is a system that allows the cultivation of a whole plant, organ, tissue or cells under aseptic conditions. This system provides all the nutrients, energy and water required for plant or explant growth in the nutrient medium. Besides, appropriate light and temperature settings are provided under controlled incubation conditions to promote growth. Plant growth can be manipulated by adding plant growth regulators (natural phytohormones or synthetic versions) (Gaikwad et al. 2017; Phillips and Garda 2019).

Plant hormones used in plant tissue culture have revolutionized production techniques. Because the balance between two or more hormones has been shown to reduce or increase the development of various organs in species (Hasancebi et al. 2011). Moreover, hormones may be applied to improve the production of phenolic compounds by not providing chemical stimulation in plants (Hasancebi et al. 2011). Effective breeding trials have been reported in many plant species, such as *Pistia stratiotes* L. (Aasim et al. 2013), *Ceratophyllum demersum* L. (Dogan 2019), *Campanula medium* (Gehl et al. 2020), *Nyctanthes arbor-tristis* L. (Kumar Mishra et al. 2020), *Vaccinium vitis-idaea* ssp. minus (Arigundam et al. 2020) and *Hemerocallis sp* (Matand et al. 2020) using growth regulators. In our current study, the efficacy of Thidiazuron (TDZ) and TDZ + Indole-3-acetic acid (IAA) on the *in vitro* micropropagation of *Staurogyne repens* (Nees) Kuntze, which is important in the aquarium industry. Thus, multiple productions of the plant in local sources can be achieved and the demand for plants in the domestic market can be met.

2. Materials and Method

These studies were carried out in the laboratories of the Department of Biology of Karamanoğlu Mehmetbey University. Surface sterilization of *S. repens* was achieved with an exposure of 5.5% Hydrogen peroxide (H₂O₂) for 20 minutes. Nodal meristems were used in reproduction studies.

The nodal explants were transposed to Murashige and Skoog (1962) (MS) food medium supplemented with TDZ single (0-1.50 mg/L) and TDZ (0.25-1.50 mg/L) + IAA (0.25 mg/L) combinations. In addition, 3% sucrose and 0.65% agar were added to the food medium.

The pH of the nutrient solution was made to 5.7 ± 1 through 1N NaOH and 1N HCl, and then it sterilized (1.2 atm and 120°C for 20 min). Plant parts were incubated under fluorescent lighting (16-hour and 24 °C). *In vitro* shoot regeneration trials were carried out for six weeks.

The shoots growing in the culture medium were cut (average 3 cm) and transposed to rooting medium with 0.25 mg/L IAA added. At the end of four weeks, the rooting trial was ended. Rooted shoots were then transposed to the aquarium environment to adapt to *ex vitro* conditions. Aquarium conditions were set at 24°C and 16 hours of lighting.

The trials were carried out in six replicates in glass tubes. The analysis of the obtained data was carried out through the SPSS 21.0 statistical data package. Duncan (DMRT) was chosen from Post Hoc tests. Arcsin transformation was applied for per cent data (Snedecor and Cochran 1967).

3. Results and Discussion

3.1. The effects of different TDZ concentrations on *in vitro* propagation

In this trial, the nodal explants of *S. repens* were incubated *in vitro* food media with 0-1.50 mg/L TDZ for six weeks.

Shoot development began to be observed three weeks later (Fig 1a). At the end of the six weeks, the experiment was terminated (Fig 1b) and shoot regeneration data were obtained and statistically analyzed (Table 1). Similarly, the successful cultivation of aquatic plants with tissue culture such as *Ipomoea aquatica* (Akaracharanya et al. 2001), *Spartina alterniflora* (Wang et al. 2003), *Bacopa monnieri* (Praveen et al. 2009) and *Linnophila aromatica* (Lamk.) Merr. (Dogan 2018) and have been reported in culture media with TDZ.

As can be seen in Table 1, the shoot regeneration rate was ranked between 77.77% and 100.00%. The use of high levels of TDZ reduced the degree of shoot regeneration. The number of shoots per explant was recorded between 2.42-15.36 shoots/explant. The maximum number of shoots per explant (15.36 shoots/explant) was determined in the MS nutrient medium containing 1.50 mg/L TDZ and then in the culture medium containing 1.25 mg/L TDZ (13.68 shoots/explant). The least number of shoots were obtained in the control group explants with 2.42 shoots/explant. The increase of TDZ in MS nutrient medium positively affected the number of shoots. Similarly, the lowering effect of high use of TDZ on the number of shoots has been previously reported by other researchers (Siwach and Gill 2011; Kapruwan et al. 2014; Dewir et al. 2018; Hesami and Daneshvar 2018). Kher et al. (2014) *Pluchea lanceolata* cultured in nodal explants in a nutrient medium containing 0.5-2.5 mg/dm³ TDZ and obtained the number of shoots between 6.0 ± 1.5 - 9.7 ± 3.5 and found the highest number of shoots in 0.5 mg/dm³ TDZ. *Paphiopedilum callosum*, *Paphiopedilum gratrixianum*, and *Paphiopedilum delenatii* were cultured in different TDZ-containing nutrients and a decrease in the number of shoots was reported with increasing TDZ concentration (Luan et al. 2019).

Shoot lengths were determined between 0.35-1.15 cm in the nodal explants (Table 1). The longest shoots were recorded in culture with 0.25 mg/L TDZ (1.15 cm) and then in control group explants with 1.02 cm. Short shoot lengths were seen in MS food media with 1.50 mg/L TDZ. The high use of TDZ had a negative effect on shoot length.

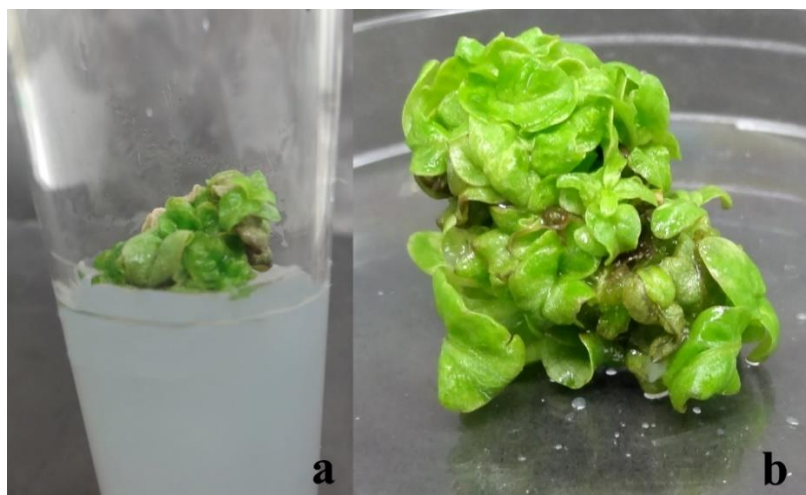


Fig. 1 Shoot regeneration of various TDZ concentrations from the nodal explants of *S. repens*. *In vitro* shoot regenerations from the nodal explants in culture with 1.50 mg/L TDZ after three weeks (a) and six weeks of culture (b).

Table 1 The influence of various TDZ doses on shoot regeneration in *S. repens*

TDZ (mg/L)	Regeneration Rate (%)	Number of shoots (shoots / explant)	Shoot length (cm)
0	77.77 ^a	2.42 ^c	1.02 ^{ab}
0.25	100.00 ^a	4.66 ^c	1.15 ^a
0.50	100.00 ^a	5.11 ^c	0.80 ^{bc}
0.75	77.77 ^a	6.15 ^{cd}	0.65 ^{cd}
1.00	83.33 ^a	9.59 ^{bc}	0.56 ^{cd}
1.25	77.77 ^a	13.68 ^{ab}	0.39 ^d
1.50	77.77 ^a	15.36 ^a	0.35 ^d

Important differences in the same column were shown in letters. ($p < 0.05$)

3.2. The effects of different TDZ+IAA concentrations on *in vitro* propagation

The nodal explants of *S. repens* were incubated in media with 0.25 mg/L IAA and 0.25-1.50 mg/L TDZ for shoot regeneration. At the end of six weeks, the trial was terminated (Fig 2) and statistical analysis was applied for shoot regeneration data (Table 2).



Fig. 2 Shoot regeneration of various TDZ+IAA combinations from the nodal explants of *S. repens*. *In vitro* shoot regenerations from the nodal explants in culture medium containing 1.0 mg/L TDZ + 0.25 mg/L IAA.

Shoot regeneration percentages in culture media containing TDZ + IAA ranged from 44.44% to 100.00%.

Maximum shoot regeneration percentage (100%) was obtained in culture medium with 1.0 mg/L TDZ + 0.25 mg/L IAA. Minimum shoot regeneration percentage (44.44%) was determined in 1.50 mg/L TDZ + 0.25 mg/L IAA application. The shoot counts were ranked between 4.42-9.44. More number of shoots was obtained as 9.44 shoots/explant in culture medium with 1.0 mg/L TDZ + 0.25 mg/L IAA. The minimum number of shoots were determined in MS nutrient medium with 1.50 mg/L BAP + 0.25 mg/L IAA. Cheruvathur et al. (2010) transferred the internodal explants of *Malaxis acuminata* D. Don in a culture medium with 1-4 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA and detected maximum shoots per explant in a culture medium with 3.0 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA.

Shoot lengths were recorded between 0.72-1.67 cm. The longest shoot (1.67 cm) was obtained in the culture medium with 1.0 mg/L TDZ + 0.25 mg/L IAA. However, the shortest shoots (0.72 cm) appeared in media with 0.25 mg/L TDZ + 0.25 mg/L IAA. Siddique et al. (2010) added TDZ + IAA in different combinations to culture media for *in vitro* production of *Cassia angustifolia* Vahl. and obtained the longest shoots in culture with 5.0 mg/L TDZ + 1.5 mg/L IAA. These results reveal that the lengths of shoots vary according to the amount of growth regulator used.

The extended shoots were transposed to the rooting environment with 0.25 mg/L IAA and multiple root formations were determined after four weeks. Rooted plants were transferred to aquariums to acclimate to *ex vitro* conditions. Elongations in plant lengths and leaves were determined within two weeks. After four weeks, they were successfully accustomed to water conditions.

Table 2. The influence of different combinations of TDZ + IAA on shoot regeneration in *S. repens*

Growth regulator (mg/L)		Regeneration Rate (%)	Number of shoots (shoots / explant)	Shoot length (cm)
TDZ	IAA			
0.25	0.25	88.88 ^a	5.24 ^{bc}	0.72 ^d
0.50	0.25	83.33 ^a	7.13 ^{abc}	1.11 ^c
0.75	0.25	88.88 ^a	7.51 ^{ab}	1.54 ^a
1.00	0.25	100.00 ^a	9.44 ^a	1.67 ^a
1.25	0.25	55.55 ^b	6.58 ^{bc}	1.49 ^{ab}
1.50	0.25	44.44 ^b	4.42 ^c	1.17 ^{bc}

Important differences in the same column were shown in letters. ($p < 0.05$)

5. Conclusion

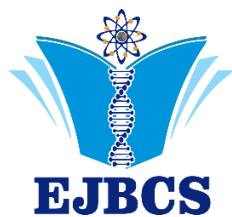
Tissue culture is an important technique for mass production of plants. Many commercial and medicinal plants are produced with this technique. In this study, multiple reproduction of *S. repens* was successfully achieved in MS nutrient medium with TDZ and TDZ + IAA. Generally, high usage of TDZ was found more useful for shoot regeneration. The single-use of TDZ according to the number of shoots was more effective than TDZ-IAA combination. However, longer shoots were obtained in TDZ-IAA applications compared to single-use of TDZ. These study results provide an important protocol for the multiple productions of *S. repens*.

Author contributions: This study was produced from the master thesis of Merve Şifa Hane Kose under the supervision of Muhammet Dogan and Gökhan Sadi.

Conflict of interest disclosure: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References

- Aasim M, Karatas M, Khawar KM, Dogan M. 2013. Optimization of sterilization and micropropagation of water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *J Appl Biol Sci.* 7(3):71-74.
- Akaracharanya A, Choi YE, Kusano T, Shinmyo A, Sano H. 2001. Efficient plant regeneration of *Ipomoea aquatica* by direct shoot formation from cotyledon segments. *Plant Biotechnol.* 18(1):77-79.
- Altman A. 2019. Plant tissue culture and biotechnology: perspectives in the history and prospects of the International Association of Plant Biotechnology (IAPB). *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 55(5):590-594.
- Arigundam U, Variyath AM, Siow YL, Marshall D, Debnath SC. 2020. Liquid culture for efficient *in vitro* propagation of adventitious shoots in wild *Vaccinium vitis-idaea* ssp. minus (lingonberry) using temporary immersion and stationary bioreactors. *Sci Hortic.* 264:109199.
- Cheruvathur MK, Abraham J, Mani B, Thomas TD. 2010. Adventitious shoot induction from cultured internodal explants of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. *Plant Cell Tiss Org.* 101:163-170.
- Dewir YH, Naidoo Y, da Silva, JAT 2018. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 37(11):1451-1470.
- Dogan M. 2018. *In vitro* shoot regeneration of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. from nodal and internodal explants. *Iğdır Univ J Inst Sci & Tech.* 8:77-84.
- Dogan M. 2019. Multiple shoot regeneration via indirect organogenesis from shoot tip and nodal meristem explants of *Ceratophyllum demersum* L. *J Anim Plant Sci.* 29(2):568-577.
- Efferth T. 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering.* 5(1):50-59.
- El-Sherif NA. 2018. Impact of plant tissue culture on agricultural sustainability. In *Sustainability of Agricultural Environment in Egypt: Part II*, Springer, Cham. pp. 93-107.
- Gaikwad AV, Singh SK, Gilhotra R. 2017. Plant tissue culture-A review. *Indian J Pharm Educ.* 2:217-220.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 32(4):272-289.
- Gehl C, Li G, Serek M. 2020. An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Campanula medium* (Canterbury bells) based on leaf disc explants. *Plant Cell Tiss Org.* 140(3):635-645.
- Hasancebi S, Kara NT, Çakır Ö, Arı Ş. 2011. Micropropagation and root culture of turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *Turk J Bot.* 35(2):203-210.
- Hesami. M, Daneshvar MH. 2018. *In vitro* adventitious shoot regeneration through direct and indirect organogenesis from seedling-derived hypocotyl segments of *Ficus religiosa* L.: an important medicinal plant. *HortScience.* 53(1):55-61.
- Kapruwan S, Bakshi M, Kaur M. 2014. Rapid *in vitro* propagation of the solid bamboo, *dendrocalamus strictus* nees, through axillary shoot proliferation. *Biotechnol Int.* 7(3):58-68.
- Kher MM, Joshi D, Nekkala S, Nataraj M, Raykundaliya DP. 2014. Micropropagation of *Pluchea lanceolata* (Oliver & Hiern.) using nodal explant. *Hortic Res.* 22(1):35-39.
- Kumar Mishra A, Nath Tiwari K, Mishra P, Kumar Tiwari S, Kumar Mishra S, Singh J. 2020. Factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration from seedling-derived nodal explants of *Nyctanthes arbor-tristis* L. and evaluation of genetic fidelity. *Plant Biosyst.* 154(2):197-205.
- Luan VQ, Tung HT, Hien VT, Hieu T, Nhut DT. 2019. Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in *Paphiopedilum* species. *Sci Hortic.* 256:108648.
- Mahna N, Vahed SZ, Hani S. 2013. Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. *Nanomed-Nanotechnol.* 4(161):1.
- Matand K, Shoemake M, Li C. 2020. High frequency *in vitro* regeneration of adventitious shoots in daylilies (*Heemerocallis* sp) stem tissue using thidiazuron. *BMC Plant Biol.* 20(1):31.
- Mineo L. 1990. Plant tissue culture techniques. *Tested Studies For Laboratory Teaching.* 11:151-174.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15(3):473-497.
- Pandey S, Pandey VC. 2018. Plant tissue culture techniques and its achievements. In *Advanced Molecular Plant Breeding: Meeting the Challenge of Food Security*, CRC Press.
- Phillips GC, Garda, M. 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 55(3):242-257.
- Praveen N, Naik PM, Manohar SH, Nayeem A, Murthy, HN. 2009. *In Vitro* regeneration of brahmi shoots using semisolid and liquid cultures and quantitative analysis of bacoside A. *Acta Physiol Plant.* 31(4):723-728.
- Siddique I, Anis M, Aref I. M. 2010. *In vitro* adventitious shoot regeneration via indirect organogenesis from petiole explants of *Cassia angustifolia* Vahl.—a potential medicinal plant. *Appl Biochem Biotechnol.* 162(7):2067-2074.
- Siwach P, Gill AR. 2011. Enhanced shoot multiplication in *Ficus religiosa* L. in the presence of adenine sulphate, glutamine and phloroglucinol. *Physiol Mol Biol Pla.* 17(3):271.
- Snedecor GW, Cochran WG. 1967. *Statistical methods.* The Iowa State Univ Press, pp 327-329.
- Wang J, Seliskar DM, Gallagher JL. 2003. Tissue culture and plant regeneration of *Spartina alterniflora*: implications for wetland restoration. *Wetlands.* 23(2):386-393.



Morphological, anatomical and ecological studies on *Orchis simia* (Orchidaceae) taxon of Eskişehir, Turkey

Derviş Öztürk^{1*} 

¹ Eskişehir Osmangazi University, Mahmudiye Equine Vocational School, Department of Plant and Animal Production, Eskişehir, Turkey

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

Received : 30/04/2020
Accepted : 06/12/2020

Abstract: In this study, in the present study reveals the morphological, anatomical and ecological characteristic of *Orchis simia* Lam. in Turkey. Plant materials of *Orchis* L. species were collected from one population, between 2018 in Eskişehir/Turkey. *Orchis simia* Lam. samples were analyzed for 5 morphological, 6 anatomical and soil characters and habitat properties. In morphological investigations, the structure of flower, lateral sepal, petal, dorsal sepal, lip, anther cap and column was determined. The findings were compared with those in Flora of Turkey. to habitat definition, *Orchis simia* grew up to 800 m to 1100 m. Also, *Quercus cerris* forests and glades were most common habitat of *Orchis simia*, found generally over calcareous soils.

Keywords: Anatomy, Morphology, *Orchis simia*, Eskişehir, Turkey.

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

The flora of Turkey is represented 1.220 genus and 11.707 species and sub-species which belong to 154 family (Ataşlar, 2018). Turkey is one of the country that has the richest flora in the World with 11.707 species and sub-species taxa. The family Orchidaceae comprises approximately 19,500 species distributed all around the world. Orchidaceae is the most famous and attractive plant family among all plant families of the world (Arditti, 1992; Pridgeon, 1992; Zarinkamar, 2006). Turkish orchidaceae were introduced in the volume 8 and 11 of Flora of Turkey. In Turkey, Orchidaceae is represented by 26 genus and about 166 species, of which 60 are endemic (Davis et al. 1978; Güner et al. 2000; Akman et al. 2014; Ataşlar, 2018; Dreesler, 1993; Güler, 2016). Terrestrial orchids have creeping, much reduced, fibrous or fleshy rhizomes or tuber like roots. *Orchis* L. taxa are terrestrial orchids and diagnosed by a basal rosette and terminal, unbranched inflorescence that is composed of small to moderately large resupinate flowers. This genus belonged to the Orchidinae tribe of which 30 species demonstrate their main distribution in the Northern regions of Europe and Asia (Renz and Taubenheim, 1984; Dressler, 1993; Kreutz, 2000; Kreutz, 2009; Bateman, 1987-1989; Fay, 2013). Most cultivars are tropical or sub-tropical. This species is known

as salep in Turkey likes many other members of Orchidaceae (Baytop, 1997; Tuzlaci, 2006).

Orchid is erect perennials with globose to ellipsoid undivided tubers. Leaves unspotted or spotted, arranged near base. Emerging spike by spathe-like leaves, many flowered, cylindrical. Flowers in various shades of red, purple, and yellow, rarely white. Bracts membranous. Lateral sepals spreading to reflexed or all sepals connivent with petals, forming a hood. Labellum directed downwards, entire or 3-lobed, with entire or divided middle lobe, glabrous or papillose above, with saccate to filiform spur. Anther firmly attached to short, erect column, folded median part of rostellum placed between the parallel anther cells (loculi). Pollinia 2, clavate, narrowed below to caudicles, attached to separate viscidia, which are enclosed in a single pouch (bursicula). Ovary cylindrical, sessile, twisted, glabrous (Davis et al. 1965-1988).

Ecology, morphology and anatomy of several Turkish Orchid species have been studied earlier (Durmuskahya, 2013; Durmuskahya et al., 2014; Aybeke et al., 2010). Turkey has a rich biodiversity and has got more than 170 taxa (Kreutz, 2009). In high of the above, the aim of the present study was to investigate new ecological, morphological and anatomical information about another orchid taxa and to provide base knowledge for further studies.

The aim of the present study is to describe the morphological and anatomical structure and in addition to investigate the epidermal cell and stomata of leaves of *Orchis simia*.

2. Materials and Method

Orchis simia was collected from Eskişehir: Sarıcakaya-Hekimdağ, below Quercus trees, 1000 m., 19.05.2018 and stored in the Eskişehir Osmangazi University Herbarium as a herbarium specimen (OUFE 12509). Determination of the species was made according to the Davis et al. 1965-1988. Morphological descriptions are based on living plants and herbarium specimens.

Anatomical investigations were applied on the leaves of samples fixed in 70% alcohol. The transverse sections discarded from mid-vessels of leaves were stained with safranin and upper and lower surface layers were investigated in the media with 20% gliserin (Altundag et al., 2012; Sevgi et al., 2012). The well-staining sections were photographed on Leica DFC 295 color camera type, Leica DM 2500 light microscope. In this study, total 5 plant samples were collected for anatomical studies.

The surface layer of soil was removed and soil samples taken from 0-5 and 5-15 cm depth were analysed. The samples were air dried, ground, passed through a 2 mm sieve and subjected to physico-chemical analysis. Total soluble salts, pH, calcium carbonate content and texture were determined by the methods outlined in detail by Hartikainen H, Kerko E. (2009).

3. Results

Plant 15-45 cm. Basal leaves usually broadly lanceolate and unspotted. Spike ovoid to conical, with flowers opening from top downwards. Flowers whitish pink, with an upswept hood; lip conspicuous and in shape of a man with body.



Fig. 1 *Orchis simia* habitat view

Orchis simia is labellum 15-20 mm, centre whitish-rose, deeply segmented near base into linear lateral lobes, middle lobe ligulate, divided into 2 linear lobules; all lobules darker purple towards apex. Spur cylindrical. Fl. 4-5. Grassy hillsides, Scrub, on calcareous soils, Quercus scrub, 900-1000 m. (P.H. Davis, 1965-1988) (Fig 1-2).

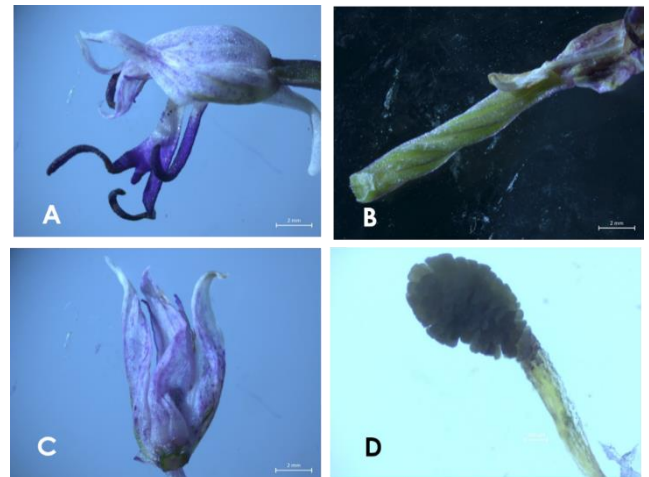


Fig. 2 *O. simia* morphology: A flower, B Spur, C lateral lobes, D lip, anther cap and column

Cross section of root showed single layered epidermal cells. The cell length was longer than width ($30-60 \times 45-100 \mu\text{m}$). Cortex consisted of 7-12 layered parenchymatous cells. The shape of cortex cells ranged from oval to globular. These cells were $60-100 \mu\text{m}$ in diameter and their walls were thin. Parancymatic cells located far from center were smaller than the ones close to center (Fig. 1A). Similar results have been earlier reported by several authors in members of Orchidaceae family (Aykebe et al., 2010; Sevgi et al., 2012; Durmuskahya et al., 2014). Endodermal cells ($35-50 \times 45-100 \mu\text{m}$) with thickened wall were seen. Pericycle was single-layered and located under endodermis. (Fig. 3, Tab. 1).

Table 1 Root anatomy measurement of *O. simia*

	Width (μm)		Length (μm)	
	Min.	Max.	Min.	Max.
Root				
Epidermis	35	50	55	80
Cortex	60	100	100	160
parenchyma				
Endodermis	30	45	50	70

The anatomical section of stem showed thick cuticle layer. Under this layer there was a single layered epidermis. Epidermal cells were square or rectangular shaped, $35-150 \times 30-50 \mu\text{m}$. 8-16 layers of cortex cells were found under epidermis with $20-30 \mu\text{m}$ diameter. Few collenchyma cells with thick and lignified cell walls were found in cortex layer. 10-24 layered collenchyma cells gave durability to the stem. (Fig. 4). Vascular bundles were collateral and located in one ring. The bundle sheath consisted of sclerenchymatic cells, at the phloem pole of vascular bundles. Pith had many lacunas in the centre of stem due to the breakup of pith into pieces (Fig. 4, Tab. 2).

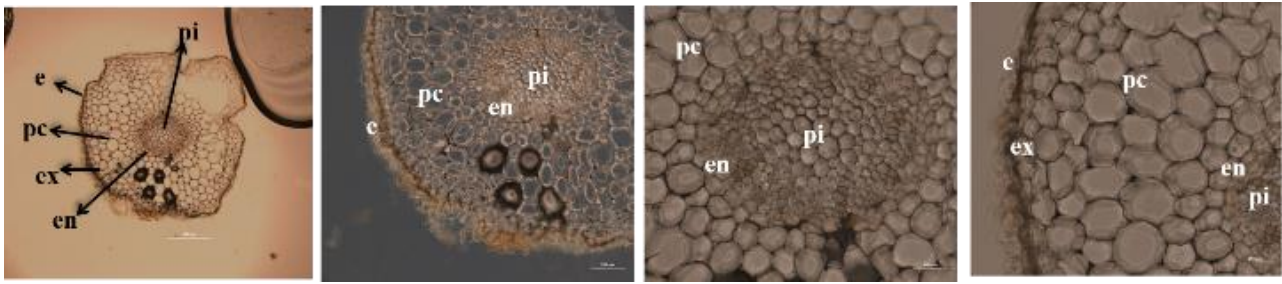


Fig. 3 Root transverse section of *O. simia* epidermis, ex exodermis, pc parenchymatic cells, en endodermis, pi pith (Bar 100 µm)

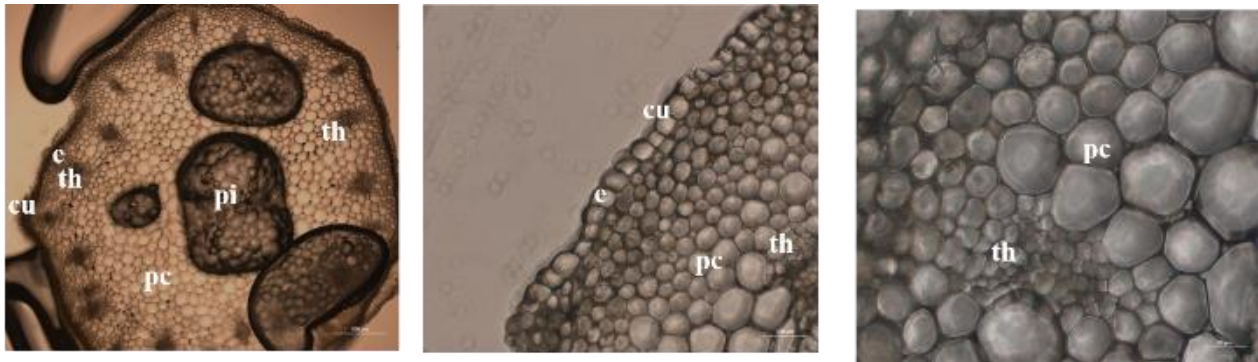


Fig. 4 Stem transverse section of *O. simia* cu cuticle, e epidermis, pc parenchymatic cells, th trachea, pi pith (Bar 100 µm)

Table 2 Stem anatomy measurement of *O. simia*

	Width (µm)		Length (µm)	
	Min.	Max.	Min.	Max.
Stem				
Epidermis	40	60	30	50
Cortex parenchyma	35	150	70	200
Trachea (diameter)	25	40	30	60

In leaves, adaxial epidermis consisted of a single layer of rectangular cells 25-80 × 30-60 µm with smooth cuticle. Abaxial epidermis was 55-80 × 35-50 µm. Adaxial epidermis cells were bigger than abaxial epidermis cells and adaxial cuticle thicker than abaxial. These features were observed in *Orchis laxiflora* Lam and *O. purpurea* Hudson by Aybeke et al. (2010). But Sevgi et al. (2012a) observed that these species had thicker cuticle on abaxial side and they had similar thickness on both adaxial and abaxial surface. Mesophyll layer was homogenous,

without any differentiation in to palisade and sponge parenchyma tissues (Fig. 5, Tab. 3).

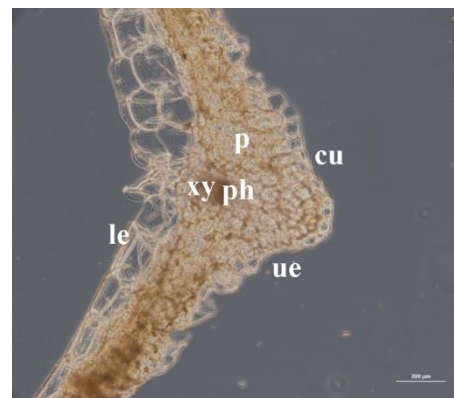


Fig. 5 Leaf transverse section of *O. simia* c cuticle, ue upper epidermis, p parenchyma, ph phloem, xy xylem, le lower epidermis (Bar 100 µm)

Leaves surface of investigated species was glabrous like many other orchid species. In leaves, adaxial epidermis consisted of a single layer of rectangular cells 50-110 × 80-85 µm with smooth cuticle. Abaxial epidermis was 45-100 × 55-155 µm. Adaxial epidermis cells were bigger than abaxial epidermis cells and adaxial cuticle thicker than abaxial. (Fig. 6, Tab. 4).

Table 3 Leaf anatomy measurement of *O. simia* (Cross-section)

	Width(µm)		Length (µm)	
	Min.	Max.	Min.	Max.
Leaves				
Adaxial epidermis	30	80	30	55
Mesophyll cells	25	55	30	40
Abaxial epidermis	25	50	35	60

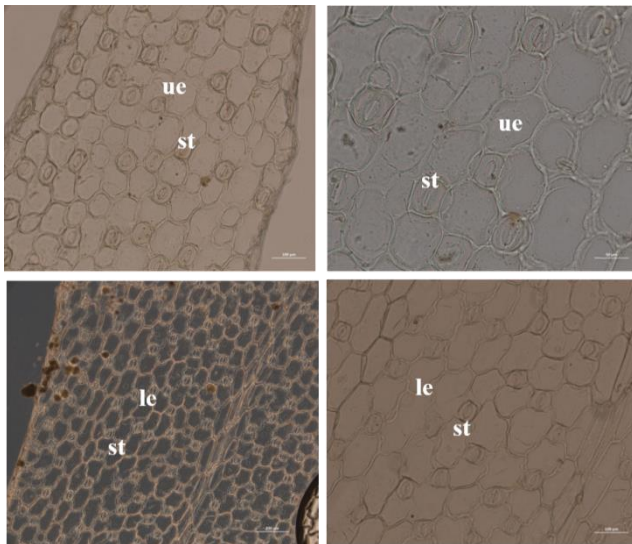


Fig. 6 Leaf epidermal peeling of *O. simia* ue upper epidermis, le lower epidermis, st stomata (Bar 100 µm)

Table 4 Leaf anatomy measurement of *O. simia* (surface)

	Width (µm)		Length (µm)	
	Min.	Max.	Min.	Max.
Leaves				
Adaxial epidermis	50	150	160	355
Mesophyll cells	45	55	40	60
Abaxial epidermis	45	110	85	210

4. Discussion

Cross section of root showed single layered epidermal cells. The cell length was longer than width (35-50 × 55-80 µm). Cortex consisted of 8-12 layered parenchymatous cells. The shape of cortex cells ranged from oval to globular. These cells were 55-110 µm in diameter and their walls were thin. Parancymatic cells located far from center were smaller than the ones close to center (Fig. 2). Endodermal cells (30-45 × 50-70 µm) with thickened wall

were seen but were not visible clearly. Pericycle was single-layered and located under endodermis. Xylem consisted of radially arranged 3 to 4 vessels, while pith was made up of parenchymatous cells. (Fig. 2).

The anatomical section of stem showed thick cuticle layer. Under this layer there was a single layered epidermis. Epidermal cells were square or rectangular shaped, 40-60 × 30- 50 µm. 7-14 layers of cortex cells were found under epidermis with 35-150 µm diameter. Few collenchyma cells with thick and lignified cell walls were found in cortex layer. Cortical parenchyma, a thinner layer than collenchyma was found with large amount of starch grains. Presence of collenchyma cells in *Ophrys* L. and *Dactylorhiza* Necker ex Nevski have been reported previously in other studies (Aybeke et al., 2010). Vascular bundles were collateral and located in one ring. The bundle sheath consisted of sclerenchymatic cells, at the phloem pole of vascular bundles. Pith had many lacunas in the centre of stem due to the breakup of pith into pieces (Fig. 3).Leaves surface of investigated species was glabrous like many other orchid species. In leaves, adaxial epidermis consisted of a single layer of rectangular cells (30-80 × 30-55 µm) with smooth cuticle. Abaxial epidermis was 25-50 × 35-60 µm. Adaxial epidermis cells were bigger than abaxial epidermis cells and adaxial cuticle thicker than abaxial. (Fig. 6).

Table 5 Leaf anatomical characters (surface)

Taxa	Epidermal cells size (width-length)	
	Abaxial (µm)	Adaxial (µm)
ita	80.00×180.00	126.50×210.50
pur	128.30 × 150.25	180.54 × 190.00
sim	90.04 × 182.30	110.40 × 282.65

ita = *O. italica*, pur = *O. purpurea*, sim = *O. simia*

It has been proven that the surface anatomy of the *O. simia* leaf has smaller cell sizes in the lower and upper epidermis surface compared to the *O. italica* and *O. purpurea* according to its systematic affinity (Tab. 5) (Sevgi et al. 2012b).

Table 6 Leaf anatomical characters (Cross-section)

Taxa	Epidermal cells size (width-length)	
	Abaxial (µm)	Adaxial (µm)
ita	60.00×130.00	109.50×180.20
pur	100.30× 120.40	184.66 × 192.00
sim	40.20 × 50.10	55.24 × 46.60

ita = *O. italica*, pur = *O. purpurea*, sim = *O. simia*

O. simia leaf anatomy is smaller in size than the lower epidermis cell and upper epidermis cell compared to *O. italica* and *O. purpurea* (Tab. 6) (Sevgi et al. 2012b).

Table 7 Distribution of *Orchis* species and their numbers on the basis of their altitude

Altitude	<i>ita</i>	<i>pur</i>	<i>sim</i>
0 - 200	+		+
200 - 400	+		+
400 - 600	+		+
600 - 800	+		+
800 - 1000	+		+
1000 - 1200			
1200 - 1400		+	+
1400 - 1600		+	

ita = *O. italica*, *pur* = *O. purpurea*, *sim* = *O. simia*

While *O. simia* spreads up to 1400 m. altitude, *O. italica* is determined to grow at altitudes between 0-1000 m and *O. purpurea* at heights between 1200-1600 m. (Tab. 7) (Sevgi et al. 2012b).

Table 8 Distribution of *Orchis* species according to their habitat

Habitat	<i>ita</i>	<i>pur</i>	<i>sim</i>
Olive farmland	+		
Macchie (Shrubland)	+		+
Meadows(Pasture)	+		
Forest land	+	+	+
Abandoned Agr.			

ita = *O. italica*, *pur* = *O. purpurea*, *sim* = *O. simia*

When we look at the distribution of *Orchis* species according to habitats, *O. simia* is found in maquis and forest areas, while *O. italica* grows in wet meadows, woodlands and maquis and olive fields, *O. purpurea* only grows in forest areas (Tab. 8) (Sevgi et al. 2012b).

5. Conclusion

In this study *Orchis simia* was investigated ecology, morphologically and anatomically. Morphological drawings of flower, lateral sepal, dorsal sepal, petal, lip, anther cap and column were made. The results obtained from morphological studies were generally consistent with the description given in the Flora of Turkey (Davis 1978 & 1988). The leaf is isolateral and compose of parenchymatic cells with intensively chloroplast. Vascular bundle is collateral and there hasn't bundle sheath. Stoma cells are located only on the abaxial side of the epidermis, as shown in Figure 4; just as Sevgi et al. (2012b) were reported. As a whole this study increase the knowledge of the morphology and anatomy in *Orchis* reporting data about the *O. simia*.

As far as ecological status is concerned, this species is rare as compared with other *Orchis* species like, *Orchis anatolica*, *Orchis italica* Poiret and *Orchis simia*. It is

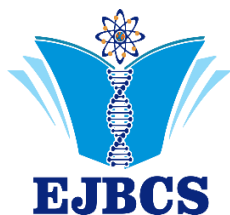
generally found in small groups. Due to its extreme habitat, its population are limited. Therefore, some scientist accept that it is an endangered species. Because of local use of this species like in preparing salep (Sevgi et al. (2012b), natural population is decreasing day by day. As compared to other orchid species, which are used for salep making, such as *Serapias vomeracea*, *Orchis anatolica*, *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich., it was found that in different habitat it blossoms in later time and these reason makes it easy target for plant collectors.

This species usually prefers calcareous soil. It is difficult to find them in clay or on alluvial soil. The soil analysis showed that at 0-5 cm soil depth, stoniness was around 16.8 % and these are mid stony soils (Cepel, 1988). The sand, silt and clay were 59. 25 and 22 % respectively at this depth. Soil was neutral with pH 6.86 and had high humus content. Total nitrogen content of the soil was 0.30 % and C:N ratio 35.15 (Table 2).

References

- Akman Y, Ketenoglu O, Kurt L, Vural M. 2014. The steppe vegetation of Inner Anatolia.
- Altundag E, Sevgi E, Kara O, Sevgi O, Tecimen HB, Bolat I. (2012). Comparative morphological, anatomical and habitat studies on *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *romana* and *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz & Taub.(Orchidaceae) in Turkey. *Pak J Bot*, 44, 143-152.
- Arditti J. 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons.
- Ataşlar E. 2018. Morpho-anatomical structure of *Orchis mascula* (L.) L. and its contribution to the taxonomy of Orchidaceae. *EIJST*. 7(6).
- Aybeke M, Sezik E, Olgun G. 2010. Vegetative anatomy of some *Ophrys*, *Orchis* and *Dactylorhiza* (Orchidaceae) taxa in Trakya region of Turkey. *Flora*. 205(2): 73-89.
- Bateman RM, Farrington OS. 1987. A morphometric study of *Orchiaceras bergonii* (Nanteuil) Camus and its parents (*Aceras anthropophorum* (L.) Aiton f. and *Orchis simia* Lamarck) in Kent. *Watsonia*, 16, 397-407.
- Bateman RM, Farrington OS. 1989. Morphometric comparison of populations of *Orchis simia* Lam.(Orchidaceae) from Oxfordshire and Kent. *Botanical journal of the Linnean Society*, 100(3), 205-218.
- Baytop T. 1997. Türkçe bitki adları sözlüğü. Türk Tarih Kurumu.
- Çepel N. 1988. Toprak İlimi Ders Kitabı; Orman Topraklarının Karakteristikleri, Toprakların Oluşumu, Özellikleri ve Ekolojik Bakımdan Değerlendirilmesi. İÜ Orman Fakültesi Yayınları, Yayın, (3416-389).
- Davis PH. 1965-1988. Flora of Turkey and the East Aegean Island. Vol: 1-10, Edinburgh: Edinburg University Press.
- Dreesler RL. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. *Dioscorides Press*, p. 314.
- Durmuskahya C, & Öztürk M. 2013. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes in Manisa, Turkey. *Sains Malaysiana*, 42(10), 1431-1438.
- Durmuskahya C, Ozdemir C, Bozdog B & Ozturk, M. 2014. Studies on the morphology, anatomy and ecology of *Ophrys lutea* cav. subsp. *minor* (guss.) o. *danesch* & e. *danesch* ex gözl & hr reinhard (orchidaceae) in Turkey. *Pakistan J. Biol Sci*, 46, 565-571.
- Efimov PG, Kuropatkin VV. 2014. (2277) Proposal to conserve the name *Orchis italica* Poir.(Orchidaceae) with a conserved

- type, and notes on the typification of *O. simia* Lam. *Taxon*, 63(2), 431-432.
- Fay MF. 2013. 751. *Orchis militaris*: Orchidaceae. *Curtis's Botanical Magazine*, 30(1), 9-17.
- Güler N. 2016. Seed micromorphology of *Orchis Tourn. ex L.*(Orchidaceae) and allied genera growing in Edirne province, Turkey. *PhytoKeys*, (68), 9.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC. 2000. *Flora of Turkey and the east Aegean Islands. Supplement 2*: 28.
- Hartikainen H, Kerko E. 2009. Lead in various chemical pools in soil depth profiles on two shooting ranges of different age.
- Kreutz CAJ. 2009. *Orchids of Turkey, Botanical Properties, Ecological Requirements, Natural Spreading Sites, Vital Threats, Precautions for Protection* (Trans & Cont. A Colak), Rota Publications, pp 55-848.
- Kreutz CAJ. 2000. *Orchidaceae*. In *Flora of Turkey and the East Aegean islands* (Eds.: A Guner, N Ozhatay, T Ekim, KHC Baser). *Edinburg University Press, Edinburgh*, 11: 274 – 303.
- Pridgeon AM. 1992. *The Illustrated encyclopedia of orchids*.
- Renz J, and G Taubenheim. 1984. *Orchis L. (Orchidaceae)*, In: *Flora of Turkey and the East Aegean islands* (Eds.: P.H. Davis). *Edinburgh, University Press, Edinburgh*. 8: 451-600.
- Sevgi E, Altundag E, Kara O, Sevgi O, Tecimen HB, Bolat I. 2012a. Studies on the morphology, anatomy and ecology of *Anacamptis pyramidalis* (L.) LCM Richard (Orchidaceae) in Turkey. *Pak. J. Bot*, 44, 135-141.
- Sevgi E, Altundag E, Kara O, Sevgi O, Tecimen HB, Bolat I. 2012b. Morphological, anatomical and ecological studies on some *Orchis* (Orchidaceae) taxa of Mediterranean region, Turkey. *JEB*. 33(2): 343.
- Tuzlacı E. 2006. *Şifa niyetine: Türkiye'nin bitkisel halk ilaçları*. Alfa yayınları.
- Vardar Y. 1987. *Botanikte preparasyon tekniği*. Ege Üniversitesi, İzmir.
- Zarinkamar F. 2006. Density, size and distribution of stornata in different monocotyledons. *Pak J Biol Sci*, 9: 1650-1659.



A validated HPLC-UV method for determination of dopamine HCl in injectable solutions

Beyza Sultan Aydın^{1*} , İbrahim Bulduk² 

¹İzmir Institute of Technology, Faculty of Science, Molecular Biology and Genetics, İzmir, Turkey
²Uşak University, Faculty of Health, Department of Chemistry, Uşak, Turkey

*Corresponding author : beyzaaydin@std.iyte.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-2960-5535>

Received : 07/11/2020
Accepted : 25/12/2020

Abstract: Dopamine is a neurotransmitter that acts in the nervous system as a chemical messenger, which helps specific neurons to interact with each other. A simple, precise, accurate HPLC method has been developed and validated for determination of Dopamine HCl (DOPHCl) in pharmaceutical formulations. Separation was performed on a C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm) with 50 mM potassium dihydrogen phosphate (pH 2.3) as a mobile phase. Mobile phase flow rate was maintained constant at 1 mL min⁻¹. High sensitivity has been achieved with UV detection at 280 nm. Parameters such as interaction of the active pharmaceutical ingredient and excipients, linearity and repeatability were investigated during analytical method development. Retention time was 6.195 min for DOPHCl. The method has been validated for DOPHCl within the range of 20-100 µg mL⁻¹ (r²=0.9998). This method has shown strong reproductibility and recovery within the determined range. This method can be used successfully in pharmaceutical formulations for routine analysis.

Keywords: Dopamine HCl, HPLC, Method, Validation

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Dopamine is a neurotransmitter that acts in the nervous system as a chemical transmitter, which helps specific neurons to interact with each other. It belongs to the family of molecules classified as monoamines, and more precisely to the catecholamine group of chemicals. Dopamine can function either as an excitatory mechanism or as an inhibitory mechanism in the central nervous system depending on the location of dopamine neurons and the receiving characteristics of the next neuron in the chain (Berridge & Robinson, 2018). It plays a significant role in neural functions, including endocrine control, breathing, locomotion, perception and reward (Neve, 2010). In addition, It plays a crucial role in the function of cardiovascular, renal and hormonal (Hussain and Lokhandwala, 2003; Jose et al., 1998; Ivan et al., 2005; Damase-Michel, Montastruc, 1995). It has been documented that a lack of dopamine containing neurons contribute to neurological disorders, such as schizophrenia and parkinsonism (Guo et al., 2009). Sensitive and precise determination of dopamine is therefore critical not just for diagnosis but also for pathological study. DOPHCl, a

hydrochloride salt of dopamine (Figure 1), is widely used in clinical therapies.

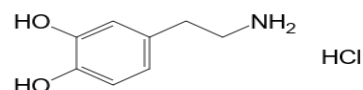


Figure 1. DOPHCl's chemical structure

A variety of techniques have been used for the determination of DOPHCl over the years. Many methods have been documented to date, such as fluorometry, chemiluminescence, high performance liquid chromatography, electrochemical processes, mass spectrometry, capillary electrophoresis for accurate analysis of dopamine. MS detector (Carrera et al., 2007; Zhao&Suo, 2008), UV detector (Liu et al.,2004) fiber optic detector (Silva et al., 2009; Ferreira et al., 2009), electrochemical detector (McKenzie et al., 2002; Cannazza et al., 2005, Sultan et al., 2014; Gupta et al., 2015; Palanisamy et al., 2015; Haldorai et al., 2017) and fluorescent detector (Yoshitake et al., 2004; Fujino et al., 2003) have been widely used in HPLC analysis. Among these methods,

electrochemical methods have attracted attention because of their practicality, sensitivity, accuracy, low cost and portability. However, many of these methods are expensive and are not available in every laboratory. In addition, many of these methods have been developed for dopamine analysis in biological matrices. A simple, fast, precise and accurate method is required for routine determination of DOPHCl in pharmaceutical dosage forms. There are injectable preparations containing DOPHCl at the concentration of 40 mg mL⁻¹ and 10 mg mL⁻¹ in the Turkish pharmaceutical market. This study introduces the validation of an analytic HPLC method of dopamine hydrochloride determination in injectable preparations.

2. Experimental

2.1. Reagents

All the chemicals used in this study were in the analytical grade and were used without further purification. Dopamine Hydrochloride standard ($\geq 98.5\%$, Sigma-Aldrich), potassium dihydrogen phosphate (99.5-100.5%, Sigma-Aldrich), ortho-phosphoric acid ($\geq 85\%$, Sigma-Aldrich) and triethylamine ($\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich) were used. Deionized water was purified by a Milli-Q system (Millipore) with conductivity lower than 0.05 $\mu\text{S cm}^{-1}$. A commercial Dopasel ampule (40 mg mL⁻¹ produced by Haver Farma Company in İstanbul, Turkey) was purchased from a local pharmacy in Uşak.

2.2. Stock standard solution

Approximately 50 mg of DOPHCl was weighed accurately using an analytical balance (Mettler Toledo ME204T) and transferred into 50 mL of volumetric flask. It has been dissolved by adding ultra pure water and make up the volume with the same solvent to label. The concentration of the prepared stock standard solution is 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Calibration standards of DOPHCl over the concentration range 20–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared by serial dilution of the standard stock solution on the day, using ultra pure water as a diluent.

2.3. Sample solution

2.5 ml of infusion solution was measured accurately and transferred in to the 100 mL of volumetric flask. Approximately 50 ml of ultra-pure water was added and sonicated to completely dissolve. The volume is filled with the same solvent, up to 100 ml. This solution was filtered through a 0.45 μm pore size membrane filter. Sample solutions (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared by diluting with ultra pure water.

2.4. Determination of λ_{max}

Standard solution (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was subjected to scanning between 200-400 nm on a UV spectrophotometer (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer). λ_{max} was obtained from the UV spectrum of standard solution.

2.5. Chromatographic conditions

The research were performed using an HPLC system (Agilent Technologies® Model 1260 Infinity) which was equipped with a UV-Visible detector. Chemstation software

was used to control the instrument and processing of the data. Chromatographic separation was conducted on Inertsil ODS C18 column, (250 x 4.6 mm, 5 μm). Mobile phase consisting of 0.05 M KH₂PO₄ buffer (pH 2.3) was used in an isocratic mode. The mobile phase was filtered through a 0.45 μm pore size membrane filter and sonicated 15 min before use. The flow rate of the mobile phase was held at 1.0 mL min⁻¹ and the injection volume was set as 20 μL . This column was kept at the temperature of 30 °C and the UV detection was conducted at 280 nm.

2.6 Method validation

The analytical method validation was performed as per ICH guidelines of Validation of Analytical Procedure: Q2 (R1) (ICH, 2005; Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1994). The validation parameters such as system suitability, linearity, precision, accuracy, specificity, the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), and robustness were addressed.

System suitability: The system suitability parameters (RSD% for retention time, RSD% for peak area, theoretical plates and tailing factor) were investigated after six replicate injections of standard solution (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) into the HPLC system.

Linearity: Standard calibration has been prepared using five standard solutions within the concentration range of 20-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In optimized chromatographic conditions, each standard solution was chromatographed for 10 minutes five times. The least squares linear regression analysis of the average peak area versus concentration data were used to evaluate the linearity of the method.

Precision: Precision was analyzed by calculating variations of the method in intraday (repeatability performed by analyzing standard solution on the same day) and inter-day (repeatability carried out by analyzing standard solution on three different days). These analyses were performed by injecting six times standard solution (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Accuracy: Recovery experiments were conducted by the standard addition technique to confirm the accuracy of the proposed method. In this method, 80%, 100% and 120% of three different levels of pure drug were added to the previously analyzed sample solutions, and DOPHCl recovery was calculated for each concentration.

Selectivity/Specificity: Selectivity is the analytical method's ability to generate an analyte response when external interference is present. The chromatograms of mobile phase solution (blank) and the sample solution were compared with chromatogram of standard solution to evaluate the selectivity of the proposed method. Retention time (Rt) and queuing factor parameters were calculated to demonstrate that chosen method was specific and selective.

LOD and LOQ: These values were determined using the standard error (s) and slope of the regression line (m) as shown in following equations.

$$\text{LOD} = 3.3 * s/m$$

$$\text{LOQ} = 10 * s/m$$

Robustness: A robustness analysis was performed to determine the impact of minor yet systematic differences in chromatographic conditions. The robustness was tested by adjusting minor differences in parameters. The modifications include different concentration of the mobile phase (± 0.01 M), mobile phase flow rates of the mobile phase (± 0.1 mL min⁻¹), pH value of the mobile phase (± 0.10), and column temperatures (± 2 °C). After each change, system suitability parameters were checked by injecting the sample solution into the chromatographic system.

Analysis of marketed formulations (injectable solution)

4 mL of above prepared sample solution was transferred into a volumetric flask of 100 mL and filled the mark with ultra-pure water to prepare the sample solution (approximately at the concentration of 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$). This sample solution was filtered using 0.45 μm pore size membrane filter and then analyzed.

3. Results

3.1. Determination of λ_{max}

The wavelength corresponding to maximum absorbance (λ_{max}) was determined as 280 nm from the UV spectrum of standard solution (Figure 2).

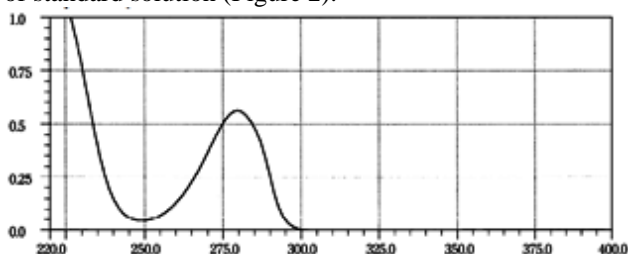


Figure 2. UV spectrum of DOPHCl (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ standard solution)

3.2. Optimization of Chromatographic Conditions

Several reverse phase HPLC columns (C18 columns) and different mobile phase were tested for the optimization study. The shorter columns did not allow for a proper peak symmetry. Proper peak symmetry was achieved on the Inertsil ODS C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μm). Thus, we decided to use the Inertsil ODS C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μm) in validation study. After the selection of the chromatographic column, the mobile phase was chosen as a 0.05 M KH₂PO₄ solution (pH 2.3). The use of chemicals harmful to the environment was avoided in the selection of mobile phase. The injection volume and column temperature were determined and, the initial isocratic program was also modified step by step. Finally, chromatographic analysis was conducted on the Inertsil ODS C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μm), column oven temperature was set to 30 °C, with a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ and a run time is 10 min at 280 nm.

3.3 Method validation

3.3.1. System suitability

Standard solution (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was injected six times to the chromatographic system at the same conditions. Symmetry factor, the number of theoretical plates, peak areas and retention times were given in Table 1.

Table 1. System suitability data

System suitability parameters	Standart Solution Concentration (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
Symmetry factor	0.903
The number of theoretical plates	6203
Peak areas (% RSD)	0.124
Retention times (% RSD)	0.123

3.3.2. Linearity

The calibration curve for DOPHCl was then plotted for peak-area versus concentration. The least squares linear regression analysis of the peak area versus concentration data was used to evaluate the linearity of this method. The calibration curve has been demonstrated in figure 3 and it's linearity parameters were given in Table 2. The linearity graphs and overlain chromatogram for DOPHCl were shown in figure 3A and 3B.

Table 2. Linearity data (n=5)

Parameter	Value
Retention time (min)	6.106
Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	20 - 100
Regression equation	$y = 16.188x - 18.018$
Correlation coefficient(R ²)	0.9999
Slope	16.188
Intercept	-18.018
LOD/ LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2.00/6.10

3.3.3. Precision

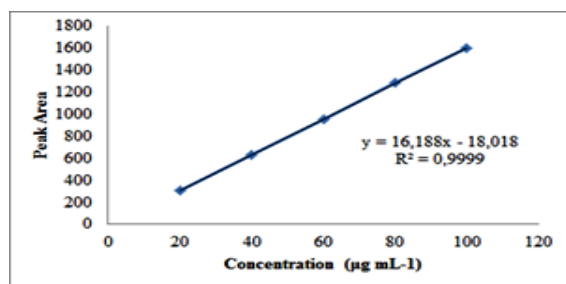
Precision study was performed by injecting six times of standard solution at the concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The precision data were given in Table 3. In any case, the % RSD values < %2 indicate that the method is precise and can be used for our intend.

Table 3. Precision data (n=6)

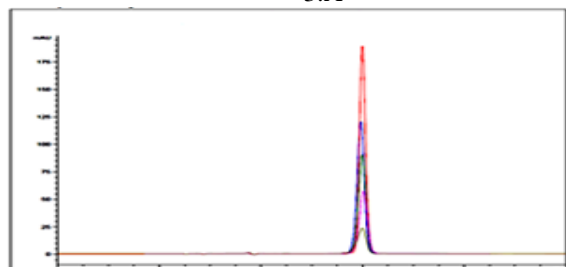
Compound	Intra-day Precision (n=6)		Inter-day Precision (n=6)	
	Mean \pm SD	RSD, %	Mean \pm SD	RSD, %
DOPHCl	100.05 \pm 0.42	0.420	100.20 \pm 0.86	0.858

3.3.4. Accuracy

A known quantity of standard solution has been added to the sample solutions previously analyzed at three different levels: 80%, 100% and 120%. The amount recovered for DOPHCl has been calculated for three concentration. The accuracy data were given in Table 4. % RSD values for all analyses were < 2%, indicating that the analytical method is accurate and suitable for our purpose.



3.A



3.B

Figure 3. A) Calibration curve for DOPHCl; B) Overlay chromatogram of five standard solutions

Table 4. Recovery data (Accuracy)

Spike Level	Amount added (µg mL ⁻¹)	Amount recovered (µg mL ⁻¹)	Recovery (%)	Average (%)	S.D.	RSD (%)
80%	80	31.97	99,37	99,39	0,026	0,027
	80	31.95	99,42			
	80	31.96	99,38			
100%	100	39.99	99,64	99,62	0,020	0,020
	100	39.98	99,60			
	100	39.96	99,62			
120%	120	117.21	99,88	99,86	0,127	0,131
	120	116.94	99,86			
	120	116.96	99,85			

3.3.5. Selectivity / Specificity

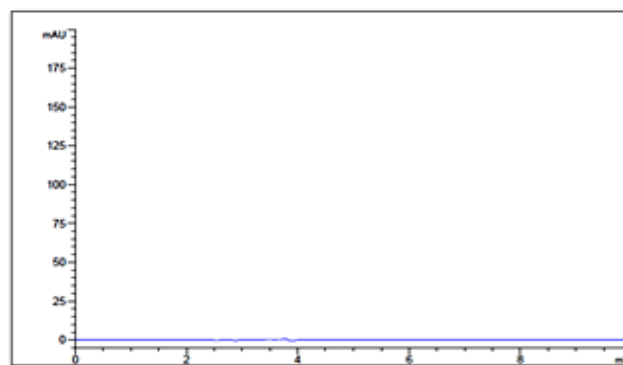
The chromatograms were shown in Figure 4. In the chromatogram of the mobile phase blank, no internally occurring peaks were observed at the retention time of DOPHCl (figure 4A). The retention time of DPHCl in chromatograms of injectable sample solution (figure 4B) and standard solution (figure 4C) are the same. DOPHCl peak did not interfere with the excipients of injectable solutions and mobile phase components, this indicates the selectivity of the proposed method. Parameters of the retention time and the tailing factor were calculated to demonstrate that the method proposed was selective and specific. Retention time and tailing factor parameters have been calculated and shown in Table 1.

3.3.6. LOD and LOQ

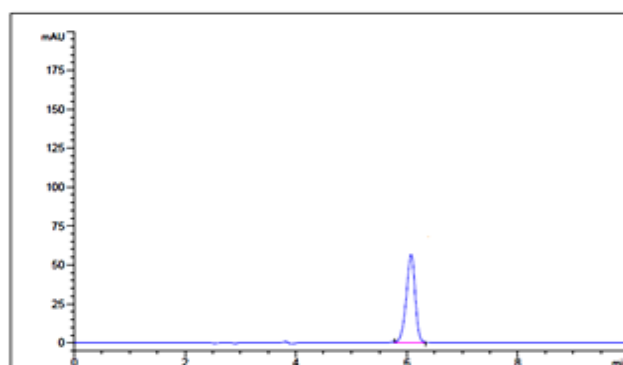
The calculated values have been given in Table 2.

3.3.7. Robustness

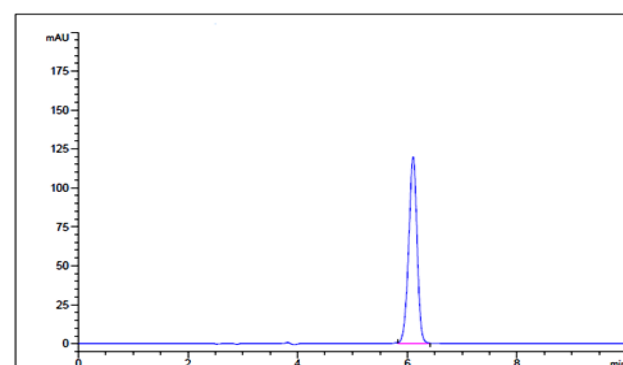
After each change, the sample solution has been injected into the chromatographic system and the system suitability parameters have been checked. The % RSD values were given in Table 5.



4.A



4.B



4.C

Figure 4. A) Chromatogram for blank solution, B) Chromatogram for injectable solution (40 µg mL⁻¹), C) Chromatogram for standard solution (60 µg mL⁻¹):

Table 5. Robustness data

Condition	Variation	Assay %	SD	RSD %
Mobile phase flow rate (1.00 mL min ⁻¹)	0.90 mL min ⁻¹	99.86	0.60	0.60
	1.10 mL min ⁻¹	99.94	0.62	0.62
Column temperature (30 °C)	28 °C	99.96	0.65	0.65
	32 °C	100.05	0.66	0.66
Buffer concentration (0.050 M)	0.040 M	100.06	0.60	0.60
	0.060 M	99.94	0.69	0.69
Mobile phase pH value (2.3)	2.20	100.12	0.67	0.67
	2.40	99.96	0.71	0.71

3.3.8. Analysis of marketed formulations (injectable solution)

The amount of DOPHCl in each injected solution was calculated by comparing the test areas with the standard area and found to be 100.05 ± 0.38 for DOPHCl. The results were given in Table 6.

Table 6. Analysis of the marketed formulation (n=3).

Solution	Label Claim (mg.mL ⁻¹ solution)	Amount of drug (mg.mL ⁻¹ solution)	% Assay \pm SD
Dopasel	40 mg mL ⁻¹	40.02	100.05 \pm 0.38

4. Discussion & Conclusion

A simple and rapid HPLC method analyzing dopamine hydrochloride was successfully developed. Run time was short (6.1 minutes) and analytical method have outstanding peak shape and acceptable parameters for system suitability. The analytical method was validated in accordance with the ICH Guidelines and was found to be linear, accurate, accurate and specific. The method developed for quantifying dopamine hydrochloride has been successfully applied in an injectable solution. With its excellent performance in terms of specificity and recovery for dopamine hydrochloride in the injectable solution, this method's adaptability to the injectable solution has been proven. Therefore, the method can be used in injectable solution forms for the daily quality control analysis of dopamine hydrochloride. The big advantage of the proposed method is that less time is required and the phosphate buffer used in the mobile phase is compatible with chromatographic system.

Authors' contributions:

BSA: Performed the experiment and made the last arrangements of manuscript.

İB: Analysed the data and wrote the article.

References

Berridge KC, Robinson TE. 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Rev.* 28(3): 309-369.

Cannazza G, Stefano AD, Mosciatti B. 2005. Detection of levodopa, dopamine and its metabolites in rat striatum dialysates following peripheral administration of l-DOPA prodrugs by mean of HPLC-EC. *J Pharm Biomed Anal* 36(5): 1079-1084.

Carrera V, Sabater E, Vilanova E. 2007. A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5 hydroxytryptamine: application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures. *J Chromatogr B.* 847(2): 88-94.

Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (1994). Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. CMC, 3.

Damase-Michel C, Montastruc JL. 1995. Tran Effects of dopaminergic drugs on the sympathoadrenal system. *Hypertens Res.* 18:119-S124.

Ferreira FDP, Silva LIB, Freitas AC. 2009. High performance liquid chromatography coupled to an optical fiber detector coated with laccase for screening catecholamines in plasma and urine. *J. Chromatogr. A.* 1216 (42):7049-7054.

Fujino K, Yoshitake S, Kehr J. 2003. Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catechols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. *J. Chromatogr. A,* 1012(2): 169-177.

Guo L, Zhang Y, Li Q. 2009. Spectrophotometric determination of dopamine hydrochloride in pharmaceutical, banana, urine and serum samples by potassium ferricyanide-Fe (III). *Anal Sci.* 25(12):1451-1455.

Gupta R, Goyal RN, Shim YB. 2015. Simultaneous analysis of dopamine and 5-hydroxyindoleacetic acid at nanogold modified screen printed carbon electrodes. *Sensors and Actuators B, Chemical,* 213:72-81.

Haldorai Y, Vilian AE, Rethinasabapathy M, Huh YS, Han YK. 2017. Electrochemical determination of dopamine using a glassy carbon electrode modified with tin-reduced graphene oxide nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical,* 247:61-69.

Hussain T, Lokhandwala MF. 2003. Renal Dopamine Receptors and Hypertension. *Experimental Biology and Medicine.* 228(2):134-142.

ICH. 2005. Q2 (R1), harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedures: text and methodology, In Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

Ivan G, Szigeti-Csucs N, Olah M, Nagy GM, Goth MI. 2005. Treatment of pituitary tumors: dopamine agonists. *Endocrine,* 28(1):101-110.

Jose PA, Eisner GM, Felder RA. 1998. Renal dopamine receptors in health and hypertension. *Pharmacol Ther.* 80:149-182.

Liu GS, Chen JN, Ma YF. 2004. Simultaneous determination of catecholamines and polyamines in PC-12 cell extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr. B.* 805(2):281-288.

McKenzie JAM, Watson CJ, Rostand RD. 2002. Automated capillary liquid chromatography for simultaneous determination of neuroactive amines and amino acids. *J Chromatogr A.* 962(1-2): 105-115.

Neve KA. 2010. *The Dopamine Receptors.* Humana Press, 585-597.

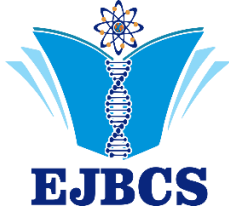
Palanisamy S, Thirumalraj B, Chen SM, Ajmal Ali M, Muthupandi K, Emmanuel R, Prakash P, Al-Hemaid F. 2015. Fabrication of silver nanoparticles decorated on activated screen-printed carbon electrode and its application for ultrasensitive detection of dopamine. *Electroanalysis.* 27(8): 1998-2006.

Silva LIB, Ferreira FDP, Freitas AC. 2009. Optical fiber biosensor coupled to chromatographic separation for screening of dopamine, norepinephrine and epinephrine in human urine and plasma. *Talanta.* 80(2):853-857.

Sultan SC, Sezer E, Tepeli Y, Anik U. 2014. Centri-voltammetric dopamine detection. *RSC Advances,* 4(59):31489-92. *Talanta.* 76 (3):690-697.

Yoshitake T, Yoshitake S, Fujino K. 2004. High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci Methods.* 140(1-2):163-168.

Zhao XE, Suo YR. 2008. Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat endbrain tissues by precolumn derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification. *Talanta.* 76(3):690-697.



Biberiye Ekstresi ve Kaolin İçeren Polivinil Alkol/Nişasta Aktif Kompozit Filmler: Yapısal, Mekanik ve Antioksidan Aktivite Özellikleri

Eslem Kavas¹, Pınar Terzioğlu^{1*}, Meltem Taş², Fatma Nur Parın¹, Çiğdem Kuş², Selçuk Küçükaydın³, Mehmet Emin Duru²

¹ Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Polimer Malzeme Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

² Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Muğla, Türkiye

³ Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Köyceğiz Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü,
Muğla, Türkiye

*Corresponding author: pınar.terzioğlu@btu.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-4114-7044>

Received : 02/05/2020
Accepted : 25/12/2020

Özet: Biyobozunur ambalaj endüstrisi, petrol esaslı plastiklerin yol açtığı atık bertaraf sorunlarının önlenmesi ihtiyacı nedeniyle sürekli büyümektedir. Son yıllarda, biyobozunur ve aktif ambalajların geliştirilmesine yönelik çalışmalar artmaktadır. Bu çalışmada, polifenollerce zengin biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ekstresi ve kaolinin polivinil alkol/mısır nişastası esaslı filmlerin özelliklerine olan etkisi incelendi. Filmlerin yapısal özellikleri FT-IR analizi, mekanik özellikleri çekme testi, morfolojik özellikleri optik mikroskop ile belirlendi. Filmlerin şişme davranışları incelendi. Ayrıca, ABTS ve DPPH radikali giderme aktivitesi ile antioksidan aktivitesi belirlendi. Ekstre ve kilin birlikte ilavesi filmin mekanik özelliklerini iyileştirirken su absorpsiyonunu da arttırdı. Ekstre ilavesi ile filmler antioksidan aktivite sergiledi. Sonuçlar bu filmlerin aktif ambalajlama uygulamalarında potansiyel adaylar olarak değerlendirilebileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: aktif ambalajlama, antioksidan aktivite, nişasta, polivinil alkol, kompozit film

Polyvinyl Alcohol / Starch Active Composite Films Containing Rosemary Extract and Kaolin : Structural, Mechanical and Antioxidant Activity Properties

Abstract: The biodegradable packaging industry is constantly growing due to the need to prevent waste disposal problems caused by petroleum-based plastics. In recent years, efforts to improve biodegradable and active packaging have been increasing. In this study, the effects of polyphenols rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and kaolin on the properties of polyvinyl alcohol / corn starch based films were investigated. Structural properties of films were determined by FT-IR analysis, mechanical properties tensile test, morphological properties by optical microscope. Swelling behavior of films was examined. In addition, antioxidant activity was determined with ABTS and DPPH radical removal activity. The addition of extract and clay improved the mechanical properties of the film while increasing the water absorption. The films exhibited antioxidant activity with the addition of extract. The results showed that these films could be considered as potential candidates in active packaging applications.

Keywords: active packaging, antioxidant activity, starch, polyvinyl alcohol, composite film

1. Giriş

Gün geçtikçe artan çevre kirliliği ve sağlık sorunları plastik ambalaj endüstrisinin pazarındaki yerini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu yüzden ambalaj sektöründe biyobozunur ve doğal polimerlerin petrol esaslı polimerlerin yerine kullanılmasına yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Mustafa ve ark. 2019). Petrol

esaslı polimerler nispeten düşük maliyete, kolay işlenebilirliğe, iyi termal ve mekanik özelliklere sahiptir (Abdullah ve Dong 2019). Fakat, plastiklerin durumu sürdürülebilirlik noktasında tartışılmaktadır. Avrupa'da her yıl 25 milyon ton atık üretilmektedir ve bu miktarın sadece %30'u geri dönüştürülebilmektedir. Bu nedenle, 2030 yılına kadar plastik ambalajların tamamının geri

dönüştürülmesi amaçlanmaktadır (Sade 2019). Ayrıca, petrol esaslı polimerlerin yerine biyopolimerlerin kullanılması çevresel problemlerin üstesinden gelmek için gereken çözüm yollarından biridir (Abdullah ve Dong 2019). Biyobozunur polimerler yani çevreci plastikler bakteri, mantar ve alg gibi mikroorganizmaların enzimatik aktivitelerinin sonucunda biyoaktif çevrede bozunarak CO₂, CH₄, biokütle, su, humus ve diğer doğal maddelere dönüşürler. Böylelikle, çevre sorunlarına neden olmazlar (Kılınç ve ark. 2017).

Biyobozunur polimerlerden olan polivinil alkol (PVA) polivinil asetatın hidrolizi sonucu elde edilmektedir (Kılınç ve ark. 2017). Nispeten yüksek maliyet, iyi mekanik ve termal özelliklerin yanı sıra iyi şeffaflık ve oksijen geçirgenliğine karşı direnci olan suda çözünebilir sentetik bir polimerdir (Abdullah ve Dong 2019). Ayrıca yapısında bulunan hidroksil grupları sayesinde, düşük bozunma oranına sahip, çapraz bağlanabilen, biyouyumlu, ve mükemmel film oluşturma gibi özellikleri olan bir polimerdir (Abdullah ve Dong 2019, Kılınç ve ark. 2017). Son zamanlarda, genellikle maliyetinin düşürülmesi ve biyobozunurluğunun artırılması amacıyla farklı polimerler ve katkıları ile kompozit ürünler elde edilmesinde kullanılmaktadır.

PVA'nın maliyetinin düşürülmesi, düşük boyutsal stabilitesinin artırılması ve biyolojik olarak parçalanabilirliğin geliştirilmesi amacıyla kullanılan polimerlerden biri nişastadır. Nişasta günümüzde pek çok uygulamada yaygın olarak kullanılan biyobozunur bir polimerdir. Amiloz ve amilopektin gibi iki farklı mikro yapıdan oluşan heterojen bir maddedir. Nişasta doğadaki bazı mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılır. PVA gibi polimerlerle harmanlandığında, mikroorganizmalar nişastaya ulaşabilmek için çeşitli enzimler salgılayarak plastiği parçalar ve bu sayede üretilen ürünün çevreye zarar vermeden bozunmasına yol açarlar (Kılınç ve ark. 2017, Gümüşderelioğlu 2012). Ambalaj sektöründe kullanılan biyobozunur PVA-Nişasta filmlerinin özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla bazı katkı (antioksidanlar ve antimikrobiyal ajanlar) ve dolgu malzemeleri ile desteklenir (Lopez-Cordoba ve ark. 2017b).

Polifenollerce zengin olan çeşitli bitki ekstreleri, polimer esaslı filmler için potansiyel doğal antioksidan ve antimikrobiyal katkılarıdır. *Labietae* ailesine ait olan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), gıda ambalajlarında katkı maddesi olarak kullanılabilir zengin antioksidan bileşik kaynaklarından biridir (Lopez-Cordoba ve ark. 2017a). Biberiye yapısında bulunan önemli biyoaktif antioksidan bileşikler flavonlar (apigenin, hesperetin, genkwanin ve cirsimaritin), fenolik diterpenler (karnosik asit, karnosol, rosmanol, rosmadial, epirrosmanol, karnosik asit o-kinon) ve fenolik asitler (kafeik asit ve rosmarinik asit)dir (Doudin ve ark. 2016, Bentayeb ve ark. 2007). Biyobozunur filmlere biberiye ekstresi ilavesi antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip aktif paketleme ürünlerinin elde edilmesini sağlamıştır (Lopez-Cordoba ve ark. 2017a, Darie-Nită ve ark. 2018).

Kaolin polimer kompozitlerde yaygın olarak kullanılan ucuz, kolay bulunabilen ve toksik olmayan bir takviye malzemesidir (Ismail ve ark. 2013, Kwasniewska ve ark. 2020). Biyopolimer matrisine kaolin ilavesi ile filmlerin su buharı geçirgenliğinin azaltılması ve gaz bariyer özelliklerinin geliştirilmesini sağlamaktadır (Arora 2010). Ayrıca kaolin ilavesi polimerlerin termal stabilitesini ve mekanik özelliklerini iyileştirmektedir (Lu ve ark. 2012).

Bu çalışmanın amacı, kaolin ve biberiye ekstresi ilavesinin polivinil alkol/mısır nişastası esaslı döküm yöntemiyle üretilen kompozit filmlerinin özellikleri üzerindeki etkisini incelemektir. Dört farklı kompozisyona sahip filmlerin hazırlanmasında plastikleştirici olarak sitrik asit ve çapraz bağlayıcı olarak glüteraldehit kullanıldı. Elde edilen filmlerin su tutma, suda şişme kapasitesi, yapısal, morfolojik ve mekanik özelliklerinin yanı sıra antioksidan aktiviteleri belirlendi.

2. Materyal ve Metot

2.1 Malzemeler

Filmlerin hazırlanmasında, glüteraldehit çözeltisi (%50'lik, Alfamol), kaolin (yoğunluk 2,6 g/cm³, moleküler ağırlık 258,16 g/mol, 5,5 µm, ZAG Kimya), metanol (Emsure, Merck), mısır nişastası (Güneş Nişastası), PVA (yoğunluk 0,4-0,6 g/cm³, saflık % 87,8, ZAG Kimya), sitrik asit (gıda saflığında, Aksu) ve Tween 80 (Sigma-Aldrich) kullanıldı.

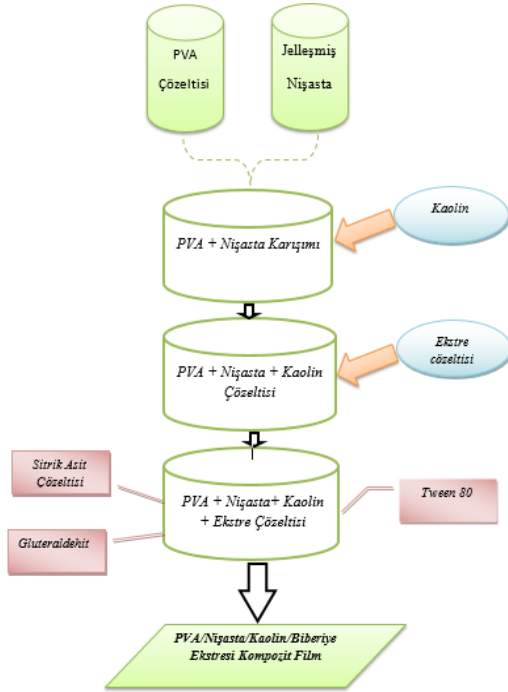
2.2 Biberiye Ekstresi

Rosmarinus officinalis L., Mentеше, Muğla, Türkiye'de toplandıktan sonra bitki yaprakları metanol ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi çözücü yenilenecek 4 kez tekrarlandı. Rotary evaporatör ile çözücüsü uzaklaştırılan ekstre kullanılabilecek kadar +4°C'de muhafaza edildi.

2.3 Filmlerin Hazırlanması

Bu çalışmada PVA/Nişasta, PVA/Nişasta/Biberiye Ekstresi, PVA/Nişasta/Biberiye Ekstresi/Kaolin esaslı dört farklı kompozit film dökme metodu ile üretildi (Şekil 1). Filmlerin kompozisyonu Tablo 1'de gösterilmektedir. PVA/Nişasta/Ekstre/Kaolin filmini (PS3-PS4) üretmek için PVA (4 g) distile su (20 mL) içerisinde 70°C'de ve 60 rpm hızda karıştırılarak PVA çözeltisi elde edildi. Uygun miktarda nişasta jelleştirildi. PVA sulu çözeltisi ve jelleştirilmiş nişasta birleştirilerek 70°C'de 30 dk karıştırıldı. Kaolin saf suda (5 mL) vortex karıştırıcı yardımıyla dağıtıldı ve çözeltinin içerisine eklenerek 30 dk karıştırıldı. Ardından biberiye ekstresi (0.05 g) metanolde (5 mL) çözülerek karışıma eklendi ve yarım saat karıştırıldı. Elde edilen homojen çözeltinin içerisine Tween 80 (50 µL) ilave edildi ve 30 dk boyunca ortam sıcaklığında karıştırıldı. Aynı bir beherde sitrik asit saf suda çözdürülerek karışmakta olan çözeltinin içerisine ilave edildi. Yarım saat sonra, glüteraldehit (25 µL) çözeltiye eklenerek 10 dk karıştırıldı. Elde edilen çözelti sık gözenekli süzgeçten süzülerek 40 mL çözelti cam petri kabına (12 cm) döküldü. Kurutma işlemi 40°C etüvde 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Filmler etüvden alındıktan sonra 1 gece boyunca çeker ocak altında muhafaza

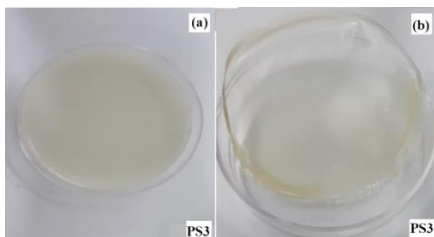
edildikten sonra ağız kilitli plastik torbalarda muhafaza edildi. PVA/Niştasta/Ekstre (PS2) ve PVA/Niştasta (PS1, kontrol filmi) kompozit filmleri de aynı aşamalar takip edilerek sırasıyla kaolin ve ekstre-kaolin içermeyecek şekilde hazırlandı.



Şekil 1. Kompozit film üretimi akış şeması

Tablo 1. PVA / mısır niştastası esaslı kompozit filmlerin kompozisyonu

Numune Kodu	PVA (%) w/v	Niştasta (%) w/v	Biberiye Ekstresi (%) w/v polimer çözeltisi)	Kaolin (%) w/w polimer çözeltisi)	Sitrik Asit (%) w/w polimer ağırlığı)
PS1	80	20	-	-	10
PS2	80	20	0.1	-	10
PS3	80	20	0.1	1	10
PS4	80	20	0.1	3	10



Şekil 2. PVA/Niştasta/Biberiye Ekstresi/Kaolin a) film çözeltisi b) filmi dijital kamera görüntüsü

2.4 Filmlerin Karakterizasyonu

FT-IR analizi: Filmlerin FT-IR spektrumu, 4000–500 cm^{-1} tarama aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte Thermo Scientific Nicolet i550 spektrometresi kullanılarak elde edildi.

İç yapı tayini: Film çözeltisini oluşturan polimer ve katkı maddelerinin iç yapıları stereo mikroskop (Leica M125, Leica Mi-crosystems; Heerbrugg, İsviçre) ile belirlendi. Filmlerin iç yapıları optik mikroskop (Nikon Eclipse LV150N, Japonya) ile belirlendi.

Mekanik özellikler: Filmlerin mekanik özellikleri, Shimadzu AGS-X universal test cihazı ile ASTM D882 standardına göre gerçekleştirildi.

Kalınlık: Filmlerin kalınlığı 5 ayrı noktadan Asimeto ABS tip dijital kumpas ile belirlendi. Bu amaçla her bir filmin 5 farklı noktasından ölçüm yapıldı ve ortalaması alındı.

Su absorpsiyon kapasitesi: Film örnekleri 2 cm x 2 cm boyutunda kesildi ve kuru ağırlıkları (W_{kuru}) tartıldı. Ardından, numunelerin kare örnekleri, 24 saat boyunca oda sıcaklığı şartlarında bulunan 20 mL su içine daldırıldı. Süre sonunda suyun içinden alınan numunelerin ıslaklığı kağıt peçete yardımıyla hafifçe alındıktan sonra ıslak ağırlığını ($W_{yaş}$) ölçmek için tartıldı. Filmlerin su emme kapasitesi aşağıdaki formül ile hesaplandı (Abdullah ve Dong 2019, Mathew ve ark. 2018a).

$$W_{abs}(\%) = \left[\frac{W_{yaş} - W_{kuru}}{W_{kuru}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Suda çözünürlük: Su absorpsiyon testlerinden elde edilen tüm şişmiş numuneler, 60°C'ye ayarlanmış etüvde (ECOCELL 55 L) 24 saat bekletildi. Etüvden alındıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğuyan numunelerin kuru ağırlık (W_{son}) tartımı yapıldı. Numunelerin suda çözünürlüğü aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Taghizadeh ve ark. 2013).

$$W_s(\%) = \left[\frac{W_{kuru} - W_{son}}{W_{kuru}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Antioksidan aktivite: Filmlerin antioksidan aktivitesi Darie-Nita ve ark. (2018) metoduna göre belirlendi. Sonuçlar üç deneyin ortalaması ± standart sapma şeklinde gösterildi.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Kalınlık, Su Absorpsiyon Kapasitesi ve Suda Çözünürlük

Kompozit filmlerin kalınlık, su absorpsiyon kapasitesi ve suda çözünürlük değerleri Tablo 2'de gösterilmektedir. Filmlerin kalınlığı 0,33-0,36 mm aralığında değişmektedir. Kaolin ve biberiye ekstresi ilavesinin filmlerin kalınlığında artışa neden olduğu ve bu artışın ilave edilen kaolin miktarının %1'den %3'e artması ile sürdüğü belirlendi. Bu sonuç film çözeltisindeki katı madde miktarındaki artıştan dolayıdır. Benzer bulgular Jafarzadeh ve ark. (2016)

tarafından gerçekleştirilen nano-kaolin katkısının irmik unu esaslı filmlerin özelliklerine olan etkisinin belirlendiği çalışmada elde edilmiştir. Kitosan/kaolin esaslı filmlerin kalınlığının da artan miktarda kaolin ilavesi ile arttığı ve kalınlığın filmin şeffaflığı hakkında bilgi verebileceği belirtilmiştir (Neji ve ark. 2020).

Su absorpsiyonu, kompozitlerin uygulanmasını değerlendirmede önemli bir parametredir (Lu ve ark. 2012). Deney sonuçları PS1 filminin su absorpsiyon kapasitesinin %239,74 olduğunu gösterdi. Sadece biberiye ekstresi ile zenginleştirilen film (PS2) kontrol numunesi (PS1) ile karşılaştırıldığında filmin su absorpsiyon kapasitesinin düşük oranda düştüğü saptandı. Kaolin ilavesinin PS3 ve PS4 filmlerinin su absorpsiyon kapasitesinin PS1 filmine oranla sırasıyla yaklaşık 1,70-1,90 kat arttığı gözlemlendi. Bu artış killerin hidrofilik yapıda olmasından ve su moleküllerinin, kil kristallerinin yanıl genişlemesine neden olmasından kaynaklanmaktadır (Taghizadeh ve ark. 2013).

Filmlerin suda çözünürlüğünün ekstre ve ekstre-%1 kil ilavesi ile azaldığı belirlendi. Benzer sonuçlar metil selüloz/montmorillonit (Tunç ve Duman, 2010) ve kitosan/kaolin esaslı (Neji ve ark. 2020) filmlerde gözlemlenmiştir. Bu durum biyopolimer matris ile ekstre ve kaolinin hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağlarının güçlü etkileşimi ile filmin bariyer özelliklerinin artmasından ve dekompozisyonunun azalmasından kaynaklanmaktadır (Neji ve ark. 2020, Chen ve ark. 2019, Jafarzadeh ve ark. 2016). Kil miktarındaki artış filmin çözünmesini arttırmıştır çünkü aglomere olan kaolin suyun filme daha kolay girmesine sebep olmuştur (Johansson ve Clegg 2015).

Tablo 2. Kompozit filmlerin kalınlık, su absorpsiyon kapasitesi ve suda çözünürlük değerleri

Numune Kodu	Kalınlık (mm)	W _{abs} (%)	W _s (%)
PS1	0,33	239,74	15,14
PS2	0,34	229,67	14,17
PS3	0,34	402,68	12,72
PS4	0,36	454,30	18,58

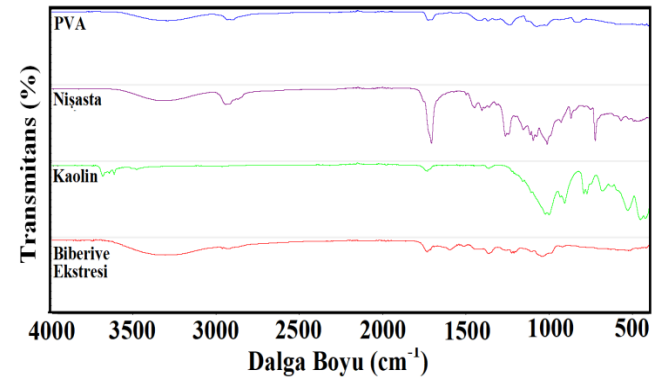
3.2 FT-IR analizi

Kompozit filmi oluşturan polimerler ve katkı maddelerine ait FT-IR spektrumu Şekil 3'de verilmektedir. PVA, nişasta, ve biberiye ekstresinde 3500-3100 cm⁻¹ aralığında bulunan geniş bant hidroksil grubunu temsil etmektedir (Terzioğlu ve Parın 2020). PVA'ya ait spektrum incelendiğinde 2935 ve 1732 cm⁻¹'de sırasıyla CH₂ asimetrik gerilme ve C-O gerilme pikleri tespit edildi

(Parın ve ark. 2020). CH gruplarının deformasyon titreşim piki 1404 cm⁻¹'de görülmektedir (Bal-Öztürk ve Akgüner 2020). Nişastaya ait spektrumda ise 1160 ve 1100 cm⁻¹'deki pikler glikosidik bağ titreşiminin bir kanıtı olarak C-O-C gerilmesine aittir (Dolaz ve ark. 2017). Ayrıca, 933 cm⁻¹'deki pik C-O gerilmesini temsil ederken, 873 cm⁻¹'deki pik -CH deformasyonunu göstermektedir (Karahan-Toprakçı ve ark. 2019).

Kaolin için -OH'a ait pikler 3688 ve 3618 cm⁻¹'de gözlemlendi. 1005 ve 1032 cm⁻¹'de Si-O gerilme, 912 cm⁻¹'de Al-Al-OH gerilme ve 796 cm⁻¹'de Si-O-Al gerilme pikleri tespit edildi. Ayrıca, 682 ve 534 cm⁻¹'deki pikler Si-O ve Si-O-Al gerilmelerini temsil etmektedir (Kumar ve Lingfa 2020).

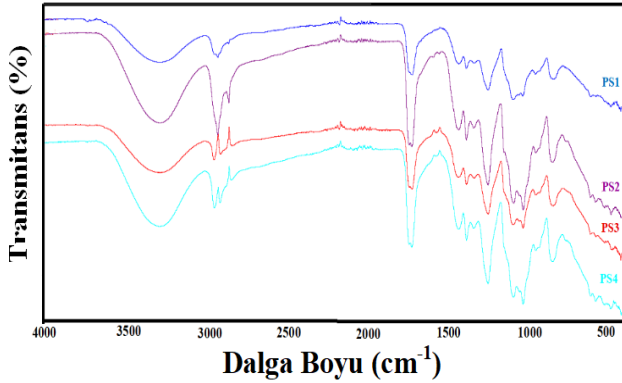
Biberiye ekstresi, aromatik ve fenolik gruplar içeren çok çeşitli organik moleküllere sahiptir. FT-IR spektrumu incelendiğinde biberiye metanol ekstresinde bulunan polifenoller ~1600 cm⁻¹'de tespit edildi. Ayrıca, fenolik gruplara ait C-H gerilmesi (2931 cm⁻¹), C=O grupları (1740 cm⁻¹), C=C halka gerilmesi (1597 cm⁻¹ ve 1517 cm⁻¹) ve C-OH gerilmesi (1264 cm⁻¹ ve 1029 cm⁻¹) belirlendi (Estevez-Areco ve ark. 2018, Eskandarabadi ve ark. 2019).



Şekil 3. PVA, nişasta, kaolin ve biberiye ekstresinin FT-IR spektrumu

Kompozit filmlerin FT-IR spektrumu Şekil 4'de gösterilmektedir. PVA/Nişasta kompozit filminin (PS1) FT-IR spektrumu incelendiğinde OH gruplarının gerilmesi (3400- 3200 cm⁻¹), C=O gerilmesi (1712 cm⁻¹), CH₂ bükülme (1420 cm⁻¹), CO gruplarının deformasyon titreşimi (1330 cm⁻¹), CH grubu sallanma titreşimleri (1240 cm⁻¹)'ne ait karakteristik pikler belirlendi (Popescu ve ark., 2018). PVA/nişasta filmine biberiye ekstresinin ilavesi (PS2) ile 2920 cm⁻¹'de bulunan CH₂ metil grubuna ve C=O gerilmesine ait piklerin yoğunluğunda artış meydana gelmiştir. PS2 filminde 1024 cm⁻¹'deki artış biberiye ekstresindeki aromatik bileşiklerden dolayıdır (Ionita ve ark., 2015). Kil-ekstre içeren filmlere (PS3-PS4) ait spektrumlar incelendiğinde 2929 ve 2904 cm⁻¹'de iki adet yeni pik oluştuğu belirlendi. Özellikle %3 kil içeren filme (PS4) ait spektrum PS1 filmi ile karşılaştırıldığında 1712, 1372, 1240, 1020 ve 838 cm⁻¹'deki piklerde artış meydana geldiği görülmektedir. Bu değişimler kil-ekstre-

polimer matris bileşenleri arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4. Kompozit filmlerin FT-IR spektrumu

3.3 Mekanik Özellikler

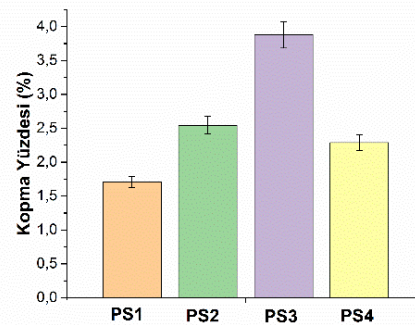
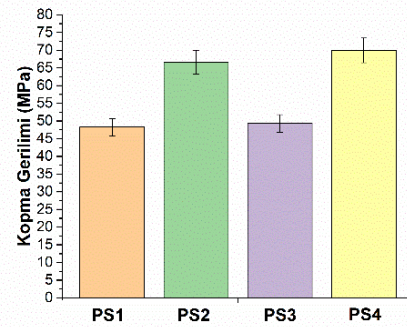
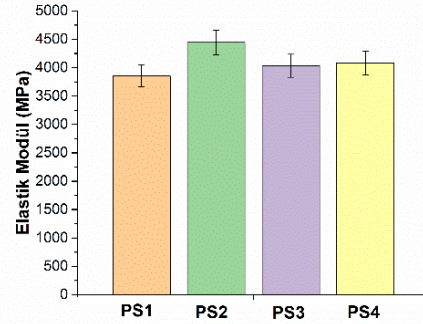
Ambalajlardan içerisindeki malzemelerin depolanması ve taşınması sırasındaki süreçte uygun mukavemet ve esnekliğe olması beklenmektedir. Kompozit filmlerin mekanik davranışı, polimer zincirindeki moleküller arası ve moleküller içi etkileşimlerin dağılımı ve yoğunluğu ile yakından ilişkilidir (Kasai ve ark. 2018). Kompozit filmlerin mekanik özellikleri Tablo 3 ve Şekil 5 'de gösterilmektedir.

PVA/nişasta kompozit filminin (PS1) kopma gerilmesi $48,26 \pm 3,46$ MPa ve kopma uzaması $1,71 \pm 0,025$ olarak belirlendi. Literatür çalışmaları incelendiğinde gliserol ile plastikleştirilen PVA:Nişasta oranı 70:30 olan filmlerin kopma gerilmesinin ve kopma uzamasının sırasıyla 24 MPa ve % 27,5 (Jose ve ark. 2017) iken PVA:Nişasta oranı 50:10 olan filmlerin bu özelliklerinin 18.4 MPa ve %184 (Wu ve ark. 2019) olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada, PVA:Nişasta oranının 80:20 olması ve plastikleştirici olarak sitrik asitin ve özellikle çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehitin birlikte kullanımının filmlerin kopma gerilmesini arttırdığı belirlendi. Singha ve Kapoor (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da PVA/Nişasta blendlerine sitrik asit ile birlikte gluteraldehit kullanımının filmlerin kopma gerilmesini arttırdığı belirtilmiştir.

Filmlere ekstre ve kaolin-ekstre ilavesinin filmlerin mekanik özelliklerini iyileştirdiği tespit edildi. Mekanik özelliklerdeki artış film kompozisyonunu oluşturan malzemelerin iyi etkileşim gösterdiğini ve uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır. Biberiye ekstresinin ilavesi ile kontrol filminin (PS1) kopma uzaması $1,71 \pm 0,02$ 'den $2,54 \pm 0,44$ 'e çıktı. Farklı bitki ekstreleri içeren biyofilmlerde benzer bulgular raporlanmıştır (Nouri ve Nafchi 2014, Ju ve ark. 2019). Kopma uzamasındaki artış biberiye ekstresinde bulunan fenolik bileşikler ile PVA ve nişasta molekülleri arasındaki etkileşimler ile ilişkilidir (Homayouni ve ark. 2017, Ju ve ark. 2019). En yüksek kopma uzamasının PS3 filmine ait olduğu tespit edildi. Kaolin miktarının %1'den %3'e çıkarılması

durumunda kopma uzamasının azaldığı belirlendi. Bu durumun %3 oranında kaolinin aglomere olmasından ve film matrisinde yeterince homojen biçimde dağılmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Guo ve ark. 2019). Sonuçlar, ekstre ve kaolin-ekstre ilavesinin filmlerin esnekliğini arttırdığını gösterdi.

Filmlerin kopma gerilmeleri incelendiğinde ekstre ve kaolin-ekstre ilavesinin filmin kopma gerilmesini ve elastik modülünü arttırdığı belirlendi. Java eriği ekstresi içeren PVA esaslı filmlerin kopma gerilmesinin az miktarda ekstre ilavesi ile arttığı artan miktarda ekstre ilavesinin ise kopma gerilmesinde düşüşe neden olduğu belirtilmiştir (Kasai ve ark. 2018).



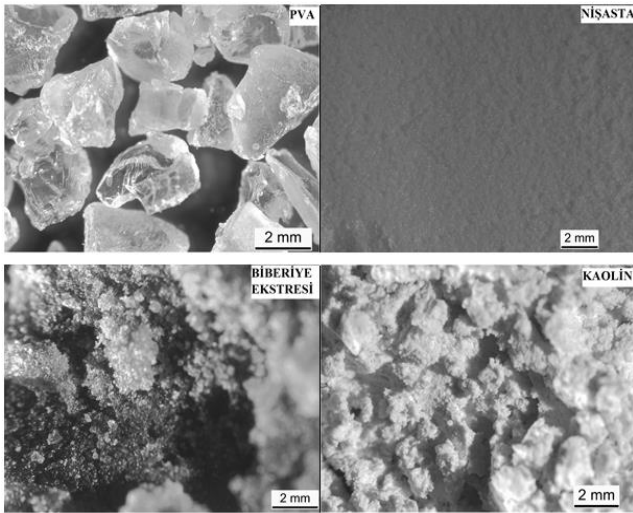
Şekil 5. Kompozit filmlerin mekanik özellikleri a) elastik modül b) kopma gerilimi c) kopma yüzdesi

Tablo 3. Kompozit filmlerin mekanik özellikleri

Numune Kodu	Elastik Modülü (MPa)	Kopma Gerilmesi (MPa)	Kopma Uzaması (%)
PS1	3851,76 ± 306,55	48,26 ± 3,46	1,71 ± 0,02
PS2	4444,62 ± 632,05	66,68 ± 5,47	2,54 ± 0,44
PS3	4033,58 ± 100,26	49,34 ± 2,24	3,87 ± 0,22
PS4	4081,95 ± 227,81	69,95 ± 12,17	2,29 ± 0,45

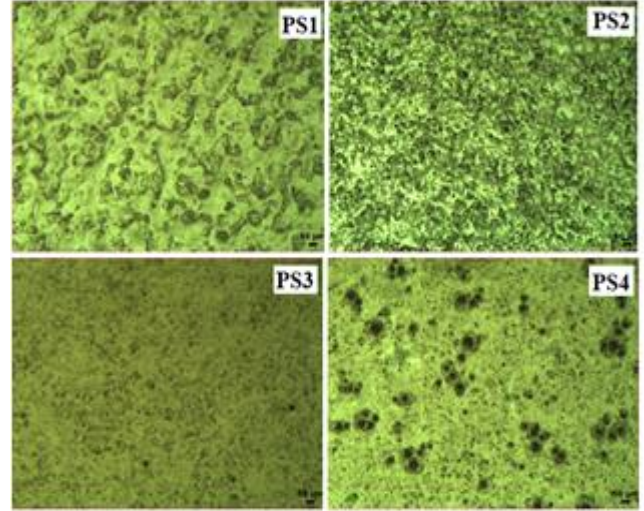
3.4 Morfoloji

PVA, nişasta, biberiye ekstresi ve kaolinin optik mikroskop görüntüleri Şekil 6'da verilmektedir. PVA taneciklerinin düzensiz şekillere ve farklı parçacık boyutlarına sahip olduğu görülmektedir. Biberiye ekstresi ve kaoline ait taneciklerin ise aglomera olduğu belirlendi.



Şekil 6. PVA, nişasta, biberiye ekstresi ve kaolinin optik mikroskop görüntüleri (2.5 kX)

Kompozit filmlerin optik mikroskop görüntüleri Şekil 7'de verilmektedir. Film yüzeylerinin heterojen olmakla beraber birbirinden farklı olduğu tespit edildi. PS3 filminin daha homojen bir yüzey görüntüsüne sahip olduğu belirlendi. PS4 filmine ait görüntü incelendiğinde yüksek konsantrasyonda (%3) kaolin ilavesinin kaolin partiküllerinin bir araya gelerek aglomere olmasına neden olduğu ve film matrisinde heterojen dağılım gösterdiği görüldü. Ayrıca, kaolin partiküllerinin dairesel şekle sahip olduğu gözlemlendi.



Şekil 7. Kompozit filmlerin optik mikroskop görüntüleri

3.5 Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Oksidatif reaksiyonlar, gıda maddelerinin görünümünü, besin değerini ve kalitesini olumsuz yönde etkileyerek renk değişikliğini, ekşimeyi ve kötü tatların gelişimini teşvik eder (Liu ve ark. 2019). Antioksidanlar, oksitleyici zincir reaksiyonlarını sonlandırarak serbest radikalleri temizleyebilen mikrobileşenlerdir (Eskandarabadi ve ark. 2019). Bu yüzden antioksidan aktivite aktif paketleme için önemli bir özelliktir. ABTS⁺ katyonu radikal giderim ve DPPH serbest radikal giderim metodu paketleme filmlerinin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Filmlerin antioksidan aktivitesi ABTS⁺ katyonu radikal giderim ve DPPH serbest radikal giderim metodu ile belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4 ve Tablo 5'de gösterilmektedir. PVA/nişasta esaslı kontrol filmi oldukça düşük antioksidan aktivite gösterdi. Her iki yöntemde de en yüksek antioksidan aktivitenin PS2 filmine ait olduğu ve PS4 filminin aktivitesinin bu filme yakın olduğu belirlendi. Sonuç olarak, biberiye ekstresinin polimer matrise ilave edilmesi ile filmlerin antioksidan aktivitelerinin arttığı gözlemlendi. Bu durum, biberiye ekstresinin antioksidan özelliğe sahip karnozik asit, karnosol, rosmarinik asit gibi fenolik bileşiklerce zengin bileşimi ile ilişkilidir (Song ve ark. 2020). Biberiye ekstresi ile birlikte kaolin ilavesinin filmlerin aktivitesini az bir miktar düşürdüğü belirlendi. Benzer sonuçlar, Eskandarabadi ve ark. (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada antosiyanin, biberiye ekstresi ve ZnO/ demirle sabitlenmiş montmorillonit takviyeli etilen vinil asetat esaslı aktif akıllı filmler için raporlanmıştır. Biberiye ekstresi ve antosiyanin ilavesi ile filmlerin antioksidan aktivitesi artarken, diğer katkılarla birlikte filmlerin aktivitelerinde düşüş meydana gelmiştir. Bu durumun katkı maddelerinin eşzamanlı varlığının sinerjik etkisinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, Piñeros-Hernandez ve ark. (2017) da kasava nişastasına biberiye ekstresi ilavesi ile filmlerin polifenol içeriğinin arttığını ve

böylece filmlerin DPPH yöntemine göre antioksidan aktivitelerinde artış olduğunu bildirmiştir.

Tablo 4. Kompozit filmlerin ABTS⁺ katyonu radikal giderim aktiviteleri

Numune Kodu	ABTS ⁺ katyonu radikal giderim aktivitesi (% İnhibisyon)			
	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml
PS1	5,18±0,5	17,67±0,9	23,76±0,5	37,85±0,4
PS2	46,79±1,1	52,56±0,8	64,43±0,3	72,99±1,1
PS3	29,09±1,2	37,67±0,4	41,01±1,2	54,18±0,8
PS4	33,02±0,2	42,44±0,7	54,12±1,0	68,07±1,0
BHA	82,63±0,2	86,7±0,2	90,75±0,2	95,89±9,1
α-Tokoferol	81,81±0,1	85,83±0,2	88,79±0,1	94,96±0,2

Tablo 5. Kompozit filmlerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi

Numune Kodu	DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% İnhibisyon)			
	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml
PS1	17,05±1,2	27,45±1,3	38,87±1,0	41,55±1,0
PS2	38,21±0,7	49,16±0,5	54,64±0,8	63,64±0,8
PS3	33,11±0,3	40,56±0,3	45,15±0,1	51,07±0,2
PS4	29,25±1,0	36,98±0,7	48,15±0,7	59,09±0,8
BHA	86,58±0,2	88,36±0,3	97,79±0,1	96,05±0,1
α-Tokoferol	87,7±0,2	90,07±0,2	94,74±0,1	96,12±0,1

4. Sonuç

Çözelti döküm yöntemi ile antioksidan özelliğe sahip biberiye ekstresi ve kil içeren PVA-niştasta esaslı filmler başarılı bir şekilde elde edildi. Filmlerin su absorpsiyon kapasitesinin % 239,74-454,30 aralığında değiştiği belirlendi. En yüksek su absorpsiyon kapasitesine sahip olan filmin %0,1 biberiye ve %3 kaolin içeren örnek olduğu tespit edildi. Mekanik özellikler incelendiğinde PVA/niştasta esaslı filmin mekanik özelliklerinin ekstre ve kil ilavesi ile iyileştiği gözlemlendi. Yine %0,1 biberiye ve %3 kaolin içeren filmin en yüksek kopma gerilmesi değerini (69,95 ± 12,17 MPa) sergilediği belirlendi. Beklenen bir sonuç olarak PVA/niştasta esaslı filmlere

biberiye eksteresini ilavesi ile filmlerin *in vitro* biyoaktivitelerinin önemli ölçüde arttığı belirlendi. Sadece biberiye ekstresi içeren film ise en iyi ABTS⁺ katyonu radikal giderim (% 72,99±1,1) ve DPPH serbest radikal giderim kapasitesi (% 63,64±0,8) sergiledi. Genel olarak sonuçlar, bu filmlerin aktif gıda ambalaj filmi uygulamaları için potansiyel adaylar olarak değerlendirilebileceğini ortaya koydu.

Yazar katkıları:

Eslem KAVAS: Deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesi ve makalenin yazımında katkı sağlamıştır.

Pınar TERZİOĞLU: Deneysel çalışmaların planlanması, yürütülmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve makalenin yazımında katkı sağlamıştır.

Meltam TAŞ: Antioksidan aktivite çalışmalarında görev almıştır.

Fatma Nur PARIN: Filmlerin karakterizasyonunda (FT-IR optik mikroskop ve mekanik test) görev almıştır.

Çiğdem KUŞ: Biberiyeden ekstre eldesini gerçekleştirmiştir.

Selçuk KÜÇÜKAYDIN: Antioksidan aktivite çalışmalarında görev almıştır.

Mehmet Emin DURU: Antioksidan aktivite çalışmalarında görev almıştır.

Çıkar çatışması açıklaması:

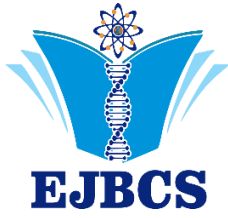
Çalışmamızı etkileyecek bir çıkar çatışması yoktur.

KAYNAKLAR

- Abdullah ZW, Dong Y. 2019. Biodegradable and Water Resistant Poly(vinyl) Alcohol (PVA)/Starch (ST)/Glycerol (GL)/Halloysite Nanotube (HNT) Nanocomposite Films for Sustainable Food Packaging. *Front Mater.* 6(58):1-17.
- Arora A, Padua GWA. 2010. Nanocomposites in Food Packaging. *J Food Sci.* 75(1):R43-R49.
- Bal-Öztürk A, Akgüner ZP. 2020. İpek Fibroin/Polivinil Alkol Esaslı İlaç Taşıyıcı Yara Örtüleri, *SDÜ Fen Bil Enst Der.* 24(1):25-34.
- Bentayeb K, Rubio C, Battle R, Nerin C. 2007. Direct determination of carnosic acid in a new active packaging based on natural extract of rosemary. *Anal Bioanal Chem.* 389(6):1989-1996.
- Chen J, Chen F, Meng Y, Wang S, Long Z. 2019. Oxidized microcrystalline cellulose improve thermoplastic starch-based composite films: Thermal, mechanical and water-solubility properties. *Polymer.* 168:228-235.
- Cordoba AL, Jaramillo CM, Hernand DP, Goyanes S. 2017a. Cassava starch films containing rosemary nanoparticles produced by solvent displacement method. *Food Hydrocoll.* 71:26-34
- Cordoba AL, Jaramillo CM, Hernand DP, Goyanes S. 2017b. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocoll.* 63:488-495.

- Darie-Nita RN, Vasile C, Stoleru E, Pamfil D, Zaharescu T, Tartău L, Tudorachi N, Brebu MA, Pricope GM, Dumitriu RP, Leluk K. 2018. Evaluation of the Rosemary Extract Effect on the Properties of Polylactic Acid-Based Materials. *Materials*. 11(10):1825.
- Dolaz M, Celikci N, Zıba CA. 2017. Synthesis and Characterization of Adhesive Obtained from Waste Potato Starch: Its Application on Bobbin Cardboard. *KSU J Eng.Sci*. 20(4):30-36.
- Doudin K, Al-Malaika S, Sheena HH, Tverezovskiy V, Fowler P. 2016. New genre of antioxidants from renewable natural resources: Synthesis and characterisation of rosemary plant-derived antioxidants and their performance in polyolefins. *Polym Degrad Stabil*. 130:126-134.
- Eskandarabadi SM, Mahmoudian M, Farah KR, Abdali A, Nozad E, Enayati M. 2019. Active intelligent packaging film based on ethylene vinyl acetate nanocomposite containing extracted anthocyanin, rosemary extract and ZnO/Fe-MMT nanoparticles. *Food Packag Shelf Life*. 22: 100389.
- Estevez-Areco S, Guz L, Candal R, Goyanes S. 2018. Release kinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) polyphenols from polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibers in several food simulants. *Food Packag Shelf Life*. 18:42-50.
- Guo G, Tian H, Wu Q. 2019. Nanoclay Incorporation Into Soy Protein/Polyvinyl Alcohol Blends to Enhance the Mechanical and Barrier Properties. *Polym Compos*. 40(9):3768-3776.
- Gümüşderelioğlu M. 2012. Biyoplastikler. *Bilim ve Teknik* 76-79.
- Homayouni H, Kavosi G, Nassiri, SM. 2017. Physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of dispersion made from tapioca and gelatinized tapioca starch incorporated with carvacrol. *LWT - Food Sci Technol*. 77:503-509.
- Ionita P, Dinoiu V, Munteanu C, Turcu IM, Tecuceanu V, Zaharescu T, Oprea E, Ilie C, Anghel D, Ionita G. 2015. Antioxidant activity of rosemary extracts in solution and embedded in polymeric systems. *Chem Pap*. 69:872-880.
- Ismail H, Khoo W S, Ariffin A. 2013. Effects of Halloysite Nanotubes and Kaolin Loading on the Tensile, Swelling, and Oxidative Degradation Properties of Poly(vinyl alcohol)/Chitosan Blends. *J Vinyl Addit Techn*. 19(1):55-64.
- Jafarzadeh S, Alias AK, Ariffin F, Mahmud S, Najafi A. 2016. Preparation and characterization of bionanocomposite films reinforced with nano kaolin. *J Food Sci Technol*. 53:1111-1119.
- Johansson C, Clegg F. 2015. Effect of clay type on dispersion and barrier properties of hydrophobically modified poly(vinyl alcohol)-bentonite nanocomposites. *J Appl Polym Sci*. 132(28):1-11.
- Jose J, Al-Harhi MA. 2017. Citric acid crosslinking of poly (vinyl alcohol)/starch/graphene nanocomposites for superior properties. *Iran Polym J*. 26(8):579-587.
- Ju A, Baek SK, Kim S, Song KB. 2019. Development of an antioxidative packaging film based on khorasan wheat starch containing moringa leaf extract. *Food Sci Biotechnol*. 28(4):1057-1063.
- Kasai D, Chougale R, Masti S, Chalannavar R, Malabadi R B, Gani R. 2018. Influence of *Syzygium cumini* leaves extract on morphological, thermal, mechanical, and antimicrobial properties of PVA and PVA/chitosan blend films. *J Appl Polym Sci*. 135(17):46188.
- Karahan-Toprakçı HA, Turgut A, Toprakçı O. 2019. A Novel Approach for Fabrication of Thermoplastic Starch Based Biocomposites. *Tekstil ve Mühendis*, 26(115):216-223.
- Kılınç M, Tomar O, Çağlar A. 2017. Biyobozunur Gıda Ambalaj Malzemeleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 17: 988-996.
- Kumar A, Lingfa P. 2020. Sodium bentonite and kaolin clays: Comparative study on their FT-IR, XRF, and XRD. *Mater Today Proc*. 22(3):737-742.
- Kwasniewska A, Chocyk D, Gładyszewska G, Borc J, Swietlicki M, Gładyszewska B. 2020. The Influence of Kaolin Clay on the Mechanical Properties and Structure of Thermoplastic Starch Films. *Polymers*. 12(1):73.
- Liu Y, Qin Y, Bai R, Zhang X, Yuan L, Liu J. 2019. Preparation of pH-sensitive and antioxidant packaging films based on κ-carrageenan and mulberry polyphenolic extract. *Int J Biol Macromol*. 134: 993-1001.
- Lu P, Zhang M, Qian P, Zhu Q. 2012. Preparation and Characterization of Thermoplastic Starch-Kaolinite Nanocomposite Films. *Polym Compos*. 33(6): 889-896.
- Mathew S, Snigdha S, Mathew J, Radhakrishnan EK. 2018. Poly(vinyl alcohol): Montmorillonite: Boiled rice water (starch) blend film reinforced with silver nanoparticles; characterization and antibacterial properties. *Appl Clay Sci*. 161:464-473.
- Mustafa P, Niazi MBK, Jahan Z, Samin G, Hussain A, Ahmed T, Naqvi SR. 2019. PVA/starch/propolis/anthocyanins rosemary extract composite films as active and intelligent food packaging materials. *J Food Saf*. 40(1):e12725.
- Neji AB, Jridi M, Kchaou H, Nasri M, Sahnoun RD. 2020. Preparation, characterization, mechanical and barrier properties investigation of chitosan-kaolinite nanocomposite. *Polym Test*. 84:106380.
- Nouri L, Nafchi AM. 2014. Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with betel leaves extract. *Int J Biol Macromol*. 66:254-259.
- Parin FN, Terzioğlu P, Sicak Y, Yildirim K, Öztürk M. 2020. Pine honey-loaded electrospun poly (vinyl alcohol)/gelatin nanofibers with antioxidant properties. *J Tex. Inst*. doi:10.1080/00405000.2020.1773199.
- Piñeros-Hernandez D, Medina-Jaramillo C, López-Córdoba A, Goyanes S. 2017. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocoll*. 63: 488-495.
- Popescu MC, Dogaru BI, Goanta M, Timpu D. 2018. Structural and morphological evaluation of CNC reinforced PVA/Starch biodegradable films. *Int J Biol Macromol*. 116:385-393.

- Sade G. 2019. Avrupa ve Türkiye plastik atıklarla nasıl mücadele ediyor?, tr.euronews.com/2019/01/24/avrupa-plastik-atiklarla-nasil-mucadele-ediyor-turkiye-ne-yapiyor. Erişim 06.02.2020.
- Singha AS, Kapoor H. 2014. Effects of plasticizer/cross-linker on the mechanical and thermal properties of starch/PVA blends. *Iran Polym J.* 23:655–662.
- Song XC, Canellas E, Wrona M, Becerril R, Nerin C. 2020. Comparison of two antioxidant packaging based on rosemary oleoresin and green tea extract coated on polyethylene terephthalate for extending the shelf life of minced pork meat. *Food Packag Shelf Life.* 26: 100588.
- Taghizadeh MT, Sabouri N. 2013. Thermal Degradation Behavior of Polyvinyl Alcohol/Starch/Carboxymethyl Cellulose/Clay Nanocomposites. *Univers J Chem.* 2:21-29.
- Terzioğlu P, Parın FN. 2020. Biochar Reinforced Polyvinyl Alcohol /Corn Starch Biocomposites. *SDÜ Fen Bil Enst Der.* 24(1):35-42.
- Tunç S, Duman O. 2010. Preparation and characterization of biodegradable methylcellulose/montmorillonite nanocomposite films. *Appl Clay Sci.* 48: 414-424.
- Wu ZJ, Huang YC, Xiao LJ, Lin DR, Yang YM, Wang HW, Yang YQ, Wu DT, Chen H, Zhang Q, Qin W, Pu SY. 2019. Physical properties and structural characterization of starch/polyvinyl alcohol/graphene oxide composite films. *Int J Biol Macromol.* 123:569-575.



Farklı besi ortamlarında yetişen *Chlorella vulgaris* türüne ait protein ve aminoasit kompozisyonunun karşılaştırılması

Merve Kavasbaşıoğlu¹, Yaşar Aluç^{2*}, İlhami Tüzün¹

¹Kırıkkale University, Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Kırıkkale, Türkiye

²Kırıkkale University Research and Application Center of Scientific and Technological Research., Kırıkkale, Türkiye

*Corresponding author : alucyasar@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-2650-2290>

Received : 05/05/2020
Accepted : 25/12/2020

Özet: Kırıkkale Kapulukaya barajından izole edilen ve TAP (Tris-Acetate-Phosphate) besiyeri, Nitrat eklemeli TAP besiyeri (N-TAP), Kırıkkale Üniversitesi kampüs gölü (GÖL), Makina ve Kimya Endüstrisi Kurumu (MKEK) atık suyu olmak üzere 4 farklı besi ortamında yetiştirilen mikroalg *Chlorella vulgaris*'in büyüme parametreleri (hücre sayımı, optik yoğunluk ve Klorofil-*a*) takip edilmiştir.

Hızlı büyüme evresinde, besin tuzlarından azotun besi yeri konsantrasyonları tedrici olarak azalmasına rağmen, fosforun azalmayıp yatay şekilde değerler gösterdiği saptanmıştır. Alglerin kimyasal strateji olarak ortamda baskın bulunduğu düşünülen $H_2PO_4^-$ formunun kullanılmasına öncelik verdiği bu formun tükenmesini takiben HPO_4^{2-} formunu (besi yerlerine göre MKEK ve GÖL için 8. gün, TAP ve N-TAP için 12. gün) kullanmaya başladıkları tahmin edilmektedir. Bu durum, mikroalglerin hücre kültürü süresince en iyi hayatta kalma yöntemlerini seçerken, makroelementler arasındaki dönüşümlere başvurduğu ve hasat sonunda nihai bir sonuç olarak ortaya çıktığı şeklinde değerlendirilmiştir. Makromoleküller arasındaki değişimler (FTIR analizi), besin tuzu (N veya P veya her ikisi aynı anda) açlığına dayalı stres koşullarının büyümeyi yavaşlattığına, buna karşın metabolik karbon ihtiyacının karbohidratlardan sağlandığına işaret etmiştir.

Hasatı gerçekleştirilen alglerin toplam protein miktarı sırasıyla; N-TAP (2.17 mg/BSA), TAP (1.96 mg/BSA), MKEK atık suyu (0.87 mg/BSA) ve GÖL besi ortamı (0.69 mg/BSA) olarak tespit edilmiştir. Tüm besi ortamlarında (HPLC analizi), Arjinin amino asidi en yüksektir. N-TAP ve TAP besi ortamlarında yetişen alglerin esansiyel ve esansiyel olmayan amino asit içerikleri yaklaşık 5 kat daha yüksektir. Çalışmada kullanılan atık su ve doğal su ortamları, N-TAP ve TAP besi yeri kontrol ortamlarıyla rekabet eder seviyede bulunmamıştır. Bunun sebebi, yeterli azot konsantrasyonlarına karşın fosforun sınırlayıcı rolünün daha belirgin olmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, *Chlorella vulgaris*, Amino asit, Protein, HPLC analizi

Comparison of total protein and amino acid compositions of microalgae *Chlorella vulgaris* grown in different growth media

Abstract: The microalgae species, *Chlorella vulgaris*, isolated from Kapulukaya Reservoir (Kırıkkale), were subjected to four different growth media, being (i) Tris-Acetate-Phosphate (TAP), (ii) Tris-Acetate-Phosphate enriched with N (N-TAP), (iii) Kırıkkale University Campus Lake Water (LW) and (iv) Waste Water from Mechanical and Chemical Industry Company (MKEK) in order to compare its growth by monitoring the parameters, cell count (CC), Optical density (OD) and Chlorophyll-*a* (Chl-*a*).

During the log phase, gradual decreases detected at nitrogen concentrations in all media except for N-riched medium (N-TAP) were not synchronously pronounced at phosphorus concentrations. This was speculated that $H_2PO_4^-$, being one of the two species of phosphorus acquired for growth, was used preferably until exhaustion, and then the other species HPO_4^{2-} was resorted to utilize on day 8 for MKEK and LW, and day 12 for TAP and N-TAP medium. When the differences on the respective amounts of macromolecules occurring as a results of different media and the algal growth on them were analysed, stress conditions due to either P or N starvation or both caused declines at growth but evoked the use of carbohydrates as a carbon source for metabolic demand.

Amounts of total protein measured on the harvested biomass were found to be 2,17 mg/BSA (N-TAP), 1,96 mg/BSA (TAP), 0,87 mg/BSA (MKEK) and 0,69 mg/BSA (LW), respectively. The amount of Arginine was profoundly higher amongst amino acids in all growth media. Both essential and non-essential amino acids were five-fold higher in N-TAP and TAP media compared to waste water (MKEK) and LW. This suggested a general conclusion that the used natural waters (MKEK and LW) were not compatible enough with the controlled media (TAP and TAP-N media) due mainly to that in natural waters phosphorus limited the growth despite efficient N levels.

Keywords: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, Amino acid, Protein, HPLC analy

1. Giriş

Küresel nüfusun 2050 yılına kadar üçte bir oranında artması beklenmektedir. Bu hızlı nüfus yükselişi gıda üretimine olan ihtiyacın %70 artacağı anlamına gelmektedir. Bu yüksek artış ile birlikte gıda üretiminde yetersiz kaynak ve hammadde gibi bir takım sorunların oluşmasına neden olabileceği öngörülmüştür. Alternatif kaynaklara olan ihtiyacın, özellikle protein ihtiyacının kısa sürede tedarik edilmesi beklenen ana besinlerden olduğu bilinmektedir (Becker, 2007).

Tarımsal ürünlerden elde edilmekte olan proteinin, gelecekte, ekilebilir arazi daralması, sentetik gübrelerin neticesinde tatlı su ve denizel kirlilik (ötrofikasyon) vb. nedenlerden dolayı ihtiyacı karşılayamayacağı tahmin edilmektedir. Günümüzde, alg biyokütlesi, hayvan yemi ve biyoyakıt üretimi için potansiyel bir kaynak haline gelmiş ve mikroalgler en önemli alternatif protein kaynaklarından biri olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (Angel ve ark., 2016). Bazı deniz yosunu ve mikroalg türlerinin geleneksel protein kaynakları olan et, süt, yumurta, balık gibi gıdalarla benzer protein seviyeleri içermektedir (Angell, 2016). Su yosunlarının (algler), ek gıda üretimi veya diğer endüstriyel gıda, hayvan yemi ve katkı maddeleri üretimi için kullanılacak 3. nesil hammadde kaynağı olarak kullanılması politikaları da gündeme alınmıştır (Ottens ve ark., 2006). Deniz alglerinin protein içeriği türlere göre değişebildiği ve kuru ağırlığın %9-26'sı proteinden oluştuğu tespit edilmiştir (Bleakly ve Hayes, 2017). Mikroalglerin ise, kuru ağırlığının %6-71'i proteinden oluştuğu gösterilmiştir (Richmond, 2004; Becker, 1994). Ayrıca; vitamin, mineral açısından da zengin olduğu bilinen bazı alg türlerinin bu özellikleri sayesinde insan sağlığı için önemli faydalarının olduğu bildirilmiştir (Bleakly ve Hayes, 2017). Mikroalglerin sağlıkla ilişkili katkıları çok sayıda araştırmaya konu edilmiş durumdadır (Md. Asraful ve ark., 2020; Clemens ve Steven, 2016).

Biyokütlenin üretim maliyetini azaltmak için, mikroalg üretiminde atık su arıtma ve/veya atık su kullanılması, sıklıkla başvurulan yöntemlerden birisi olmuştur. Alglerin atık su arıtımında kullanılmalarında başarılı sonuçlar sağladığı, yapılan pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır. (Richmond, 2004; Becker, 1994). Organik maddece zengin sularda algler, fotosentez yaparak serbest oksijen üretir ve bu şekilde organik maddenin aerobik bakteriyel oksidasyonunu desteklerken aynı zamanda oksidasyonla açığa çıkan karbondioksit ve nutrientler, algler tarafından yeni biyomas üretiminde kullanılmaktadır (Monfret ve Unc, 2017; Lu ve ark., 2016).

Bu çalışmada, Kırıkkale Kapulukaya barajından izole edilen *Chlorella vulgaris*, TAP (Tris-Acetate-Phosphate) besiyeri, Nitrat eklemeli TAP medium (N-TAP), Kırıkkale Üniversitesi kampüs gölü (GÖL), Makina ve Kimya Endüstrisi Kurumu (MKEK) atık suyu olmak üzere 4 farklı besi ortamında yetiştirilerek aminoasit miktarları ölçülmüştür. Doğal atık sular ve hazırlanmış besi ortamlarında alg büyümesi ve aminoasit miktarları karşılaştırmak suretiyle değerlendirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

Kırıkkale Kapulukaya barajından izole edilen, 4 farklı besi ortamında yetiştirilen *Chlorella vulgaris* türünün Klorofil-a ölçümü, optik yoğunluk ölçümü, hücre sayım işlemi, besiyeri nitrat ölçümü, alglerde toplam protein miktarı, aminoasitlerin HPLC analizi, FTIR cihazı ile organik bileşik ölçümü yapılmıştır.

2.1. Klorofil-a Ölçümü

İki mL alg örneği 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip besiyerinden uzaklaştırılmıştır. İki mL aseton ile muamele edildikten sonra vortekslenen numune, 15 dakika 80 °C'de sonikatöre konmuştur. Beş dakika 15000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı alınarak pellet kısmı atılmıştır. Süpernatant kısmı ELİSA'da ölçümler için -86 °C'de saklanmıştır (Jeffrey ve Humphrey 1975).

Optik Yoğunluk (OD) Ölçümü: AquaPen-C AP-C 100 marka cihaz kullanılarak Optik Yoğunluk (OD) ölçümü yapılmıştır. Ayrıca, OD680 nm, OD720 nm, QY ve OJIP parametreleri bir gün ara ile kaydedilmiştir (AquaPen Operation Manual).

2.2. Hücre Sayım İşlemi

Örneklerden sayım için sedimentasyon tüplerine (Uthermol) alınan 30 µl alg solüsyonu 2970 µL distile su ile seyreltilmiş ve 30 µL Lugol çözeltisi eklendikten sonra sedimentasyonun tamamlanması için 3 saat bekletilmiştir. Sedimente olan bireylerin inverted mikroskop altında sayımları gerçekleştirilmiştir.

2.3. Besiyerinde Nitrat Ölçüm

İnkübasyona bırakılan besi ortamlarından gün aşırı 2 mL besiyeri örnekleri alınarak iyon kromatografisi (IC) cihazında nitrat ve fosfat analizleri yapılmıştır.

2.4. Alglerde Toplam Protein Miktarı Tayini

Ön muamele için 10 mg alg örneği, 10 mL lizis tamponu içinde çözdürülmüştür. Çözdürülen alg örneği 1 dk. boyunca homojenize edilmiştir. Ardından sıvı azot içinde dondurularak oda sıcaklığında erimeye bırakılmıştır. Tekrar sıvı azot içinde dondurulmuş ve on dakika sonike edilmiştir. Sonikasyonun ardından yirmi dakika 15000 rpm'de +4°C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir. Ön muamele edilmiş biyokütlenin toplam protein miktarını ölçmek için Lowry (Lowry ve ark., 1951) yöntemi uygulanmıştır. Standartların hazırlanmasında 0.2-10 mg arası BSA tartılmış ve 10 mL lizis tamponu içinde çözdürülmüştür. Süpernatantlardan ve protein standartlarından 100'er µL olarak hazırlanan karışıma, 100 µL %10'luk SDS solüsyonu eklenmiş, ardından 100 µL reaktif A eklenerek vortekslenmiştir. Karışımın 50 µL'si alınmış ve 200 µL reaktif C eklenmiştir. 10 dk. karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. 20 µL reaktif C solüsyonu eklendikten sonra 45 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 750 nm'de ELISA'da ölçüm yapılmıştır. Kimyasallar Reaktif A (40 mg NaOH 10 mL distile su içinde çözdürüldü ve 0.2 g Na₂CO₃ eklendi), Reaktif B (0.1 g NaKTartarat 10 mL distile su içinde çözdürüldü ve 50 mg CuSO₄ eklendi), Reaktif C (20 µL reaktif B 1980 µL reaktif A), Folin reaktifi (1 N), %10 SDS

(5 mg SDS 100 mL distile su içinde çözdürüldü), Lizis tamponu (5 mL lizis tamponu 50 mL distile su içerisinde seyreltildi) (López ve ark., 2010).

2.5. Aminoasitlerin Analizi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

50 mg alg örnekleri 24 sa. 110°C'de 10 mL 6 mol HCl ile hidrolize edilmiştir. Hidrolizat 55°C'de vakum pompası ile kurutulmuş ve 5 mL distile su ile tekrar çözdürülmüştür. Ön işlem sonucu özdürülen numuneden ve aminoasit standartlarından 1 mL ependorflara alınmıştır. 500 µL asetonitril ilave edilmiştir. 24 µL fenilzotiyosiyanat eklenmiş ve vortekslenmiştir. 278µL trimetilamin eklenmiş ve vortekslenmiştir. Yarım saat boyunca 70°C'de degas yapılmış ve oda sıcaklığına gelene kadar beklenmiştir. 198 µL HCl eklenmiş ve vortekslenmiştir. 5 dakika 15000 rpm'de santrifüj edilerek. 0.22 µm filtreden geçirilmiştir. HPLC ayrımları, Alltech HPLC C18 kolonu (250 4,6 mm, 5 lm, Grace, IL, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Analiz, 1.0 ml.min-1 akış hızında bir elüsyon sistemi kullanılarak yapılmıştır. Mobil faz A, 0.1 mol NaAcetonitril (97:3, v/v; pH 6.5) ve mobil faz B, acetonitril- chromatographic grade suyu (4:1, v/v). Gradyan koşulları aşağıdaki gibidir: 0-13 dakika,% 100-93 A; 13-23 dk,% 93-77 A; 23-29 dak, 77-65% A; 29-35 dk,% 65-60 A; 35-40 dak; % 60-0 A; 40-45 dakika,% 100 B. Amino asitler, bir UV dalga boyu detektörü kullanılarak tespit edilmiş ve tutma sürelerinin gerçek standartlarla karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır. Niceleme, harici standart yönteme dayandırılmıştır (Xie ve ark., 2017).

2.6. Organik bileşik ölçümü (Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi, FTIR)

FTIR spektrumları, ortam sıcaklığında, Bruker Vertex 70 V marka model cihaz ile 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında (MIR bölge) ATR ataşmanı kullanılarak elde edilmiştir.

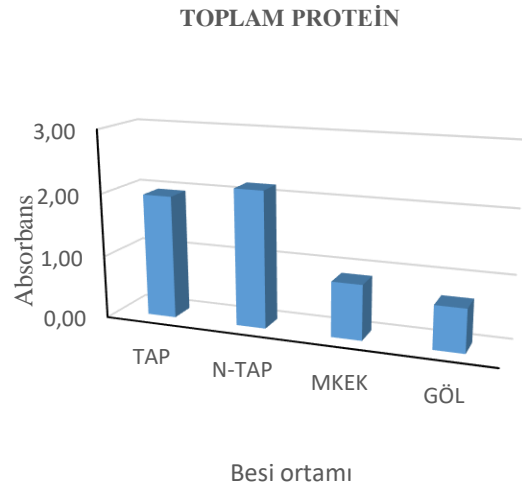
3. Sonuçlar

Chlorella vulgaris popülasyonunun, 1. gün ilk örneklemede gecikme (lag) evresinde olduğu görülmektedir. Bu evre muhtemelen ikinci günde de devam etmiş ancak örneklemelerin gün aşırı gerçekleştirilmesi nedeniyle tespit edilememiştir. Üçüncü günden itibaren hızlı bir büyüme evresine giren *Chlorella* kümelerinin söz konusu büyüme davranışı genel olarak 8. güne (veya 10. güne) kadar devam etmiştir. Bu evrede büyüme hızı en yüksektir. Bu evreyi, mikroalg biyokütlesinin maksimum seviyelere ulaştığı ve nispeten yatay bir büyüme davranışına geçtiği, 8. ve 14. günler arasında tespit edilen “durağan ya da yavaşlama” (Stationary Phase) evresi takip etmiştir. Ondördüncü günden itibaren ise, düşüş veya ölüm fazı olarak adlandırılan evreye geçildiği görülmüştür. Log fazı süresince, hızlı bir büyümenin işareti olarak OD, Birey Sayısı ve Chl-*a* değerlerinde saptanan artışlar, besin ortamlarına göre çok az farklılık göstermiştir. Bu dönemde, MKEK ve GÖL SUYU'na ait büyüme değerleri TAP-Kontrol ve N-TAP besin ortamlarına göre ihmal edilebilir derecede olmasına rağmen daha fazladır. Oysa, 8. günden sonra ortaya çıkan durağan faz süresince, MKEK ve GÖL

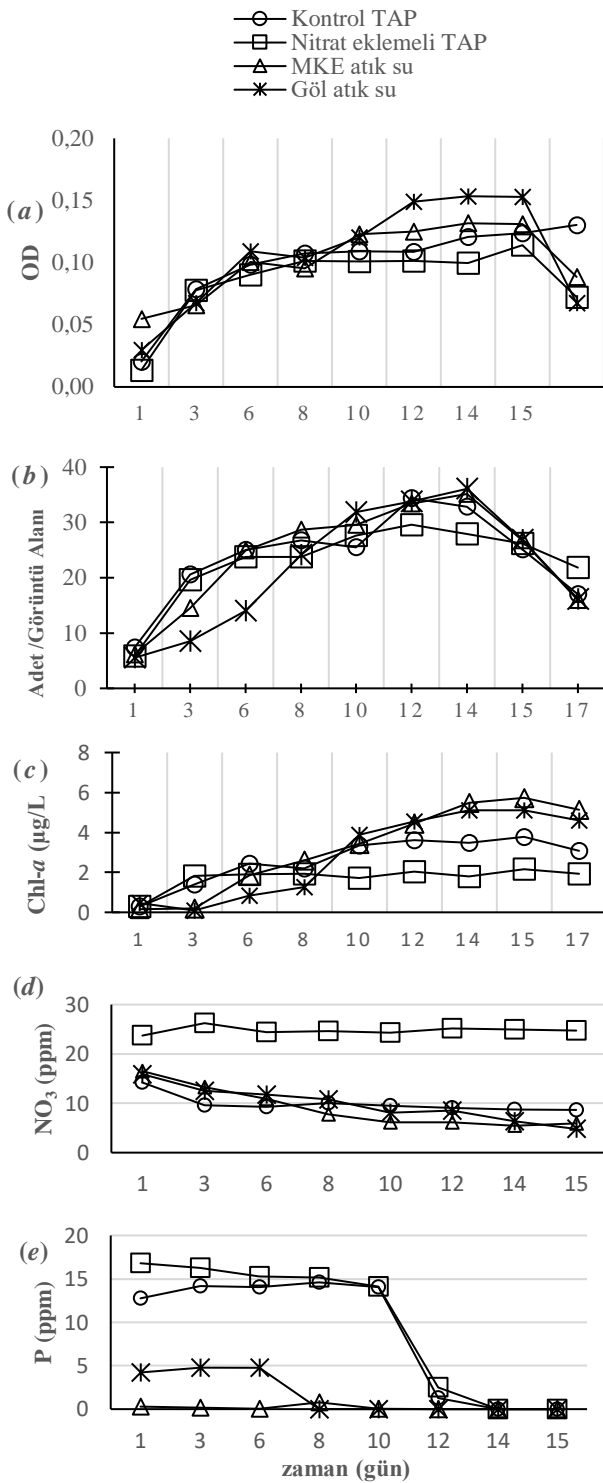
SUYU besin ortamlarına ait biyokütlenin diğerlerine oranla farkedilir derecede daha yüksek miktarlara ulaşmış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1-a, b, c).

Chlorella vulgaris'in fotosentez (büyüme) esnasında kullandığı nitrat (NO₃¹⁻) ve fosfat (PO₄²⁻) bileşiklerini ortamdaki uzaklaştırma kabiliyetini belirlemek amacıyla büyüme parametreleriyle eşzamanlı gerçekleştirilen analiz sonuçları (Şekil 1-d, e), TAP (Kontrol) besin ortamındaki azot derişimlerinin, büyümenin başından sonuna kadar tedrici olarak azaldığını göstermiştir. Özellikle 8. güne (log fazının sonuna) kadar olan bu azalma oldukça belirgindir ve durağan evrede yatay bir seyir izleyerek devam etmiştir. Bu besin yerinde, fosforun başlangıçtaki yüksek derişimleri log fazının sonuna (8.gün) kadar bir azalma göstermemiştir. Bu tarihten sonraki durağan evrede önce yavaş ve sonrasında keskin bir düşüş göstermiştir. Azot zengini (N-TAP) besin ortamı, kontrol grubu ile benzer şekilde derişimler ortaya koymuş, ancak farklı olarak lag fazında fosforun nispeten kullanıldığına işaret eden azalmalar sergilemiştir (Şekil 5). MKEK ve GÖL SUYU besin yerlerinde ise, tahmin edildiği üzere, besin tuzu derişimindeki derişimler özellikle fosfor açısından nispeten farklı bir senaryo sergilemiştir. İlk olarak, MKEK ve GÖL SUYU besin ortamlarının fosfor başlangıç konsantrasyonları, TAP ve N-TAP besin yerlerine göre oldukça düşüktür. GÖL SUYU besin ortamındaki fosfor değerleri log fazı sonuna kadar yatay bir seyir gösterdikten sonra, 8. günden itibaren (durgunluk fazında) keskin bir düşüş göstermiş ve 10. günden itibaren tamamen tüketilmiştir. En düşük başlangıç konsantrasyonlarına sahip MKEK atık suyunda ise, aynı şekilde durağan faza gelindiğinde ve devamında neredeyse tamamen tüketilmiş olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1-e).

Büyümenin düşüş evresine geçmesiyle birlikte hasat edilen ve bu son ürünlerde tespit edilen toplam protein miktarları Şekil 2'de gösterilmektedir. Buna göre, TAP-KONTROL besin yeri ve N-TAP (nitrat eklemeli) besin yerine ait biyokütlerde, diğer besin yerlerine göre daha yüksek toplam protein miktarları tespit edilmiştir. Nitratın toplam protein miktarını etkileyen en önemli faktör olabileceği not edilmiştir.



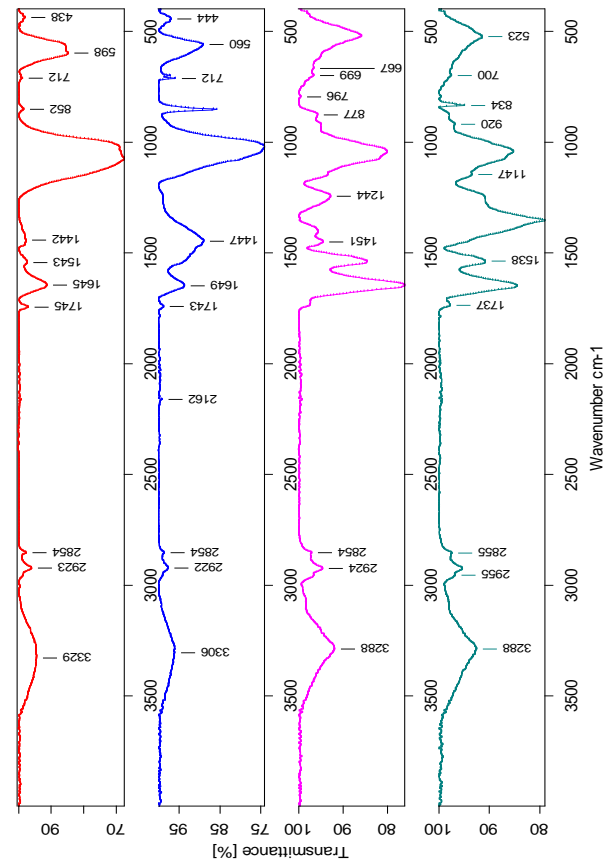
Şekil 2. Farklı besin ortamlarında *C. vulgaris*'in toplam protein miktarı garfığı.



Şekil 1. Farklı büyüme ortamlarında a) OD değerleri, b) Hücre sayıları, c) Chl-a değerleri, d) Nitrat (NO₃) değerleri ve e) Fosfat (P) değerleri zamana bağlı grafikleri.

Farklı besi yerlerinde büyümesini tamamlayan *C. vulgaris*'in hasat edilen biyomasları içerisindeki makromoleküllerin (Karbohidrat, lipit ve proteinler) teşhisleri ve miktarları FTIR analizi ile belirlenerek karşılaştırılmıştır (tablo 1). Titreşim batlarına bakıldığında amid I (C – O germe titreşimleri), amid II (N – H bükülme titreşimleri) titreşim bandları esas alındığında, 1740-1542

cm⁻¹ civarında protein bandı, 3015-2854 cm⁻¹ civarında lipit (C=O) bandı, 1080 cm⁻¹ civarında karbonhidrat bandına (C-O germe titreşimleri) işaret etmektedir. GÖL ve MKEK atık sularında protein miktarının TAP ve N-TAP besi ortamlarına göre daha az olduğu görülmektedir. Bu sonucun, toplam protein miktarlarının farklı besi yerlerinde bulunan sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Buna karşılık, farklı besiyerlerindeki karbonhidrat miktarlarının MKEK>GÖL SUYU>TAP>N-TAP olarak bir sıralama gösterdiği tespit edilmiştir. Lipidler için ortaya çıkan sıralama ise GÖL SUYU<MKEK<TAP<N-TAP olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 3).

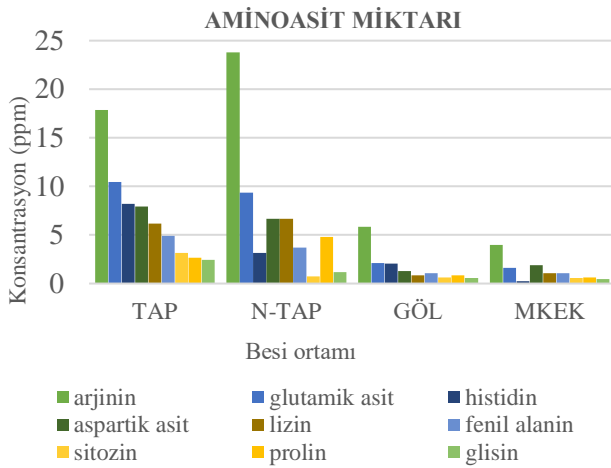


Şekil 3. Farklı besi ortamlarında yetişen *C. vulgaris*'in protein, karbohidrat ve lipit içeriğindeki farklılıkların FTIR analizi.

Hasadı yapılan alg biyomaslarında, HPLC kullanılarak aminoasit kompozisyonu ve miktarları belirlenmiş ve besi yerleri arasında karşılaştırmaları yapılmıştır. *C. vulgaris*'in azot bileşiklerinin daha fazla olduğu TAP ve N-TAP besi yerlerinde diğerlerine göre daha yüksek olarak bulunan amino asit miktarları, toplam protein miktarları ile uyumluluk göstermektedir. *Chlorella vulgaris*'te arjinin aminoasidinin bütün besiyerlerinde en fazla olduğu görülmektedir. Arjinin'in analizi yapılan toplam biyokütle içerisindeki oranları, TAP, N-TAP, GÖL SUYU ve MKEK besi yerlerinde sırasıyla %17.8, %23.8, %5.8 ve %4.0 olarak belirlenmiştir. Glutamik asit, en bol miktarda bulunan ikinci amino asittir ve TAP N-TAP GÖL SUYU ve MKEK besi ortamlarındaki yüzdeleri azalan bir şekilde sırasıyla %10.4, %9.4, besi ortamında %2.1 ve %1.9 olarak bulunmuştur.

Tablo 1. Büyüme sonunda farklı besi yerlerinde tespit edilen makromoleküllerin % miktarları

Makromolekül	Besi ortamı			
	MKEK	GÖL SUYU	TAP	N-TAP
Karbonhidrat	67	74	80	85
Lipid	95	97	93	94
Protein	85	75	92	94

**Şekil 4.** Farklı besi ortamlarında yetişen *C. vulgaris*'in aminoasit içeriği (HPLC analizi).

4. Tartışma

Çalışmada elde edilen sonuçlardan ilki, *Chlorella*'nın farklı besi yerlerinde aynı şartlar altında yetiştirilen populasyonlarının ortaya koyduğu nispeten farklı büyüme eğrileri ve son ürün biyokütlesinin makromoleküller açısından kayda değer farklılıkların ortaya çıkmış olmasıdır. Kontrol grubu olarak adlandırılan TAP besi yeri, mikroalg kültüründe en çok başvurulan ortamlardan birisidir. TAP besi yerinin bu anlamda mikroalg büyümesini destekleyen en ideal besin tuzu karışımına sahip olacağı ve optimum büyümeyi ortaya çıkaracağı beklenir. Ancak, bu çalışmadaki sonuçlar değerlendirildiğinde, MKEK ve GÖL SUYU olarak adlandırılan, sırasıyla, atık su ve doğal su niteliğindeki besi yeri ortamları, TAP besi ortamlarına göre daha yüksek biyokütle değerlerine ulaşılmasını sağlamıştır. Bu sonuç, iki farklı açıdan tartışılması gerekmektedir. Birincisi, her mikroalg üretimi çalışmasında olduğu gibi bu çalışmada da son ürün (biyokütle) verimliliği çok önemli olmakla birlikte, büyümenin en başından son ürüne gelinceye kadar bütün aşamalarda üretilen istenen makromolekül (Karbohidrat, Protein, Lipit, Karotenoid vs.) değişimleri ve bunların optimum noktadaki miktarlarının hedeflenen ürün eldesindeki verimliliğe ulaşma açısından da aynı öneme sahiptir. Nitekim, bu çalışmanın sonuçlarına göre, MKEK ve GÖL SUYU besin ortamları TAP ve azot ile zenginleştirilmiş N-TAP besi yerlerine göre daha yüksek biyokütle üretmiş olmalarına rağmen, daha düşük miktarlarda protein içeriğine sahiptir. Her besi yerindeki alg kültürleri, son aşamaya gelinceye değin, moleküller arasında yoğun değişimler yaşamış olabileceği düşünüldüğünde, son ürünlerdeki makromolekül dağılımı, hedef molekül üretimindeki verimliliği açıklayabilmek için

yeterli olmayabilir. Başka deyişle, büyümenin herhangi bir aşamasında protein miktarı MKEK, GÖL SUYU besi yeri ortamlarında diğerlerine göre daha yüksek olmuş olabilir. Bu nedenle, teknik yetersizlikler nedeniyle ölçülemeyen, büyümenin her evresindeki makromoleküllerin miktar ve değişiklikleri bu çalışmadaki eksikliklerden biri olarak not edilmelidir. Literatürdeki çok sayıda araştırma, mikroalg kültür ortamında bulunan besin tuzlarının (özellikle N ve P) miktar ve değişimlerini alg biyokütlesinin büyüme esnasındaki biyokimyasal dönüşümlerle birlikte değerlendirmektedir (Lai ve ark., 2011; Kamalanathan ve ark., 2015; Arora ve ark., 2016; Santhakumaran, 2020).

Bu çalışmada, alg büyümesine ilişkin sonuçlar incelendiğinde, her bir besiyerinde tipik mikroorganizma büyüme eğrisinin oluştuğu görülmektedir. OD, Chl-*a* ve hücre birey sayıları ile takip edilen büyümede, gecikme (Lag fazı), hızlı büyüme (Log fazı) ve durağan evreleri ayırt edilir bir şekilde ortaya çıkmıştır. Ancak, her bir evredeki alg biyoması veya spesifik büyümesi seçilen besi yerine göre farklılık göstermiştir. Bu farklılıkların, her bir ortamın besin tuzu başlangıç miktarlarına ve kompozisyonuna bağlı olarak ortaya çıktığı genel bir kural olarak kabul edilmelidir (Saito ve ark., 2008). Nitekim, büyümenin ortam kompozisyonuna ve miktarına bağlı olduğu, mikroalg kültürasyonu kullanarak yapılan diğer çalışmalarda da doğrudan veya dolaylı olarak ifade edilmiştir (Ajala ve Alexander, 2020). Ancak, bu çalışmada, lag evresi boyunca olan hızlı büyüme esnasında besin tuzlarından azotun besi yeri konsantrasyonları tedrici olarak azalmasına rağmen, büyümede kullanılan diğer temel element olan fosforun azalmayıp yatay şekilde değerler göstermesi enteresandır. Lag evresinde ortofosfat miktarlarında azalma görülmemesi, fotosentetik büyüme esnasında fosfor kullanılmadığı şeklinde yorumlanmamıştır. Bu durumun, sekonder ortofosfat halindeki fosforun ortamdan alınmış olunabileceği, çalışmada ölçümü yapılan primer ortofosfatların ise bu nedenle sekonder ortofosfat bitinceye kadar azalmadığı şeklinde bir davranış ortaya çıkardığı ihtimali üzerinde daha fazla durulmaktadır (Solovchenko ve ark., 2016). Besi yerinde bulunan fosfatın alg bireyleri tarafından alınması karmaşık bir dinamığe sahiptir. Bu konudaki en önemli faktörlerden birisi, fosfatın ortamdaki türüdür. Ortofosfatın HPO_4^{2-} veya $H_2PO_4^-$ şeklindeki serbest bileşikler fotosentezde kullanılan formlarıdır. Her ikisi arasındaki dinamik ve sürekli kimyasal dönüşümleri kültür ortamlarında da gerçekleşir ve bu değişimde en önemli kontrol edici faktör pH olarak ifade edilmiştir. Düşük pH'larda $H_2PO_4^-$ formu dominanttır (Ullrich-Eberius, 1973). Çalışmamızda, *Chlorella*'nın bütün besi ortamlarında tespit edilen lag fazındaki büyüme esnasında, ortamdaki dominant fosfor türünün $H_2PO_4^-$ olma ihtimali yüksektir. Ortamın pH ölçümleri gerçekleştirilmemiş olmasına rağmen, büyümenin başındaki pH genellikle daha düşüktür ve biyomas artışıyla birlikte ortamdaki karbon miktarının artmasıyla artar. Durgunluk fazına gelindiğinde ise $H_2PO_4^-$ tüketildiğinden alg hücrelerinin HPO_4^{2-} türünü tüketmeye başladığı düşünülebilir. Fosforun alg hücreleri tarafından alınmasını etkileyen diğer bir faktör de, besi yeri ortamında bulunan fosfor başlangıç konsantrasyonunun çok yüksek olmasıdır. Özellikle, alg bireylerinin fosforca zengin

kültüre alınmadan önce fosfor açlığı seviyesine göre fosfor alımını fizyolojik olarak yavaşlattığı söylenmiştir (Cembella ve ark., 1982). Hangi faktörün fosfor alınma dinamiklerinde baskın olduğunun anlaşılabilmesinin daha detaylı bir çalışma ile mümkün olabileceği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmaya temel teşkil eden konulardan birisi de alg büyümesinde atık su kullanımının verimliliğinin incelenmesidir. Bu amaçla kültür ortamlarındaki mikroalgün büyümesi ve besin tuzları arasındaki ilişkiye ait elde edilen bulgular, diğer bir konu hakkında da yorum yapılabilmesine olanak sunmuştur. Mikroalg büyümesine ait denemelerde kullanılan atık sulardaki fosfor ve azot, büyümenin durgunluk evresinde tamamen ortamdan uzaklaştırılmış olup, atık su arıtımında alglerin kullanılabilmesi sonucuna ilişkin önemli işaretler ortaya çıkarmıştır. Atık sular, genellikle azot ve fosfor elementlerince zengindir ve doğaya bırakıldığında ötrofikasyon gibi çok önemli bir probleme yol açmaktadır. Bu nedenle arıtılması gereklidir ki, arıtımın da önemli bir maliyeti beraberinde getirdiği bilinmektedir. O halde, çalışmamızda kullanılan *Chlorella vulgaris*'in gıda amaçlı kullanımı hedeflenerek yapılması muhtemel bir üretim faaliyeti sırasında arıtım amaçlı da kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği söylenebilir. Nitekim, dünya üzerinde hem araştırma hem de uygulamalı ölçekte başarılı sonuçların alındığı bu tür çalışmaların sayısı oldukça fazladır ve artan bir ilgiye de sahiptir (Delgadillo-Mirqueza ve ark. 2016; Monfet ve Unc, 2017; Brar ve ark., 2019; Abdul Hamid ve Lim, 2019; Shelknanlomilan ve ark., 2012). Mikroalg büyümesi esnasında ortamdan azot ve fosforun uzaklaştırılmasında etkin olan çok sayıda faktör arasında N/P oranı özellikle değerlendirilmesi gereken faktör olarak öne çıkmaktadır. İlk başta okyanuslardaki fitoplankton büyümesi için 16/1 olarak (Redfield oranı) geliştirilen bu oranın, sentetik ve doğal atık suların kullanıldığı laboratuvar ortamında (veya pilot ölçekli) yetiştirilen mikroalglerde farklı bir stokiometriye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Aslan ve Kapdan, 2006; Delgadillo-Mirqueza ve ark., 2016; Monfet ve Unc, 2017). Monfet ve Unc (2017) yayınladıkları derlemede, alg büyümesi esnasındaki N ve P giderimi veya birikiminin doğru yorumlamak için, hücre birimlerinin asimilasyon oranı, besi ortamından (substrat) alım miktarı ve organik veya inorganik formdaki nütrientlerin hücre içerisindeki birikimini ayırt edecek ölçümlerin gerektiğini öne sürmüşlerdir. Özellikle, azotun (nitrat, nitrit, amonyum ve üre), fosforun (ortofosfat) farklı formları kültürasyon esnasında sürekli değişebilen dinamik bir yapıya sahiptir ve bu durum özellikle kullanılan doğal atık su çeşidi ve kullanılan alg türüne göre farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle, büyümede N/P oranına ait yorumlarda daha detaylı bir inceleme gerektirmektedir. Bu çalışmada, azot bileşiği olarak sadece nitrat ölçümü yapılabildiği için N/P oranlarına ait yorumların yetersiz olacağı düşünülmektedir. Buna rağmen, çalışmamızda elde edilen, Göl atık suyu ve MKEK atık suyunda 8-14 günler arasında, TAP kontrol besi yerinde (12-15 günleri arasında) tespit edilen N/P oranlarının (6-10 arası) en fazla büyümeye karşılık geldiği ve en fazla fosfor gideriminin gerçekleştiği optimal oran aralığı olduğu söylenebilir. Bu değerler, Wang ve ark.,(2010) tarafından *Chlorella sp.* için 6:1, Sue ve ark.,

(2011)'nın yaptığı çalışmada 3:1 ve Aslan ve Kapdan (2006)'ın yaptığı çalışmada ise 2:1 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgulardan bir diğeri ise, büyüme sonunda ortaya çıkan protein ve amino asit miktarlarının besi yerleri arasında farklılık göstermesidir. Özet olarak, daha yüksek biyokütle oranlarının elde edildiği MKEK atık suyu ve GÖL SUYU ortamlarında daha düşük miktarlarda protein ve amino asit oluştuğu belirlenmiştir. Ortamdaki N ve P besin element değişimlerine göre üç temel makromolekülün birbirlerine dönüşümleri ve dolayısıyla büyümenin evreleri boyunca salınımlarının da değiştiği bilinmektedir (Cheng ve ark., 2016). Mikroalglerin biyodizel amaçlı azot açlığına maruz bırakıldıklarında lipid miktarlarını artırdıkları birçok çalışmada elde edilen yaygın sonuçlardan birisidir (Vassilev ve Vassileva, 2016). Bizim çalışmamızda, lipid miktarları kültür evrelerinin tamamında değil sadece deney sonlandırıldığında FTIR analiziyle ölçülmüş ve sadece besi ortamları arasındaki makromoleküllerin farklılıkları ortaya konulabilmiştir. Buna göre, bütün besi yeri ortamlarında son durgunluk evresinde, azot, ortamda tüketilerek azaltılmış ve hücreler azot açlığına maruz kalmış olmasına rağmen, MKEK ve GÖL SUYU besi ortamının daha fazla lipid moleküllerine sahip oldukları görülmüştür. Bu durumun, diğer ortam şartları aynı olmasına rağmen, besi yerlerinin azot (ve de fosfor) elementi başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Cheng ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, başlangıç konsantrasyonları daha fazla olan alg kümelerinin lipid miktarlarındaki artışın çok daha düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılara göre, azot açlığına maruz kaldıktan sonra mikroalglerin metabolik enerji açığı diğer karbon içeren bileşiklerin lipitlere dönüştürülmesiyle sonuçlanırken, başlangıç azot konsantrasyonu yüksek olduğunda bu dönüşüme daha az ihtiyaç duyulmakta ve bu da nispeten daha düşük lipid miktarlarıyla sonuçlanmaktadır. Benzer sonuçlar diğer bazı araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir (Klok ve ark., 2013; Li ve ark., 2011). Diğer karbon kaynağı olarak ortamdaki karbohidratların, dönüşümde daha az kullanılmasına bağlı olarak da, MKEK ve GÖL SUYU besi yerindeki miktarları daha fazla bulunmuştur.

C. vulgaris'deki toplam protein miktarı değerlendirildiğinde ise; kontrol (TAP) ve nitrat eklemeli (N-TAP) gruplarının toplam protein miktarları, beklenildiği gibi, diğer besiyerlerine göre daha fazladır. Bu durum NO₃ bakımından zengin besi yeri ortamlarının daha yüksek protein oluşumundan sorumlu olduğunu göstermektedir. GÖL SUYU ve MKEK ortamlarında NO₃ ve P'nin alg hücreleri tarafından daha yoğun kullanılıp tüketilmesine ve biyokütle olarak daha fazla artışlar ortaya çıkarmış olmasına rağmen, makromoleküller arasındaki miktarsal dağılımda (ortamdaki başka elementlerin bulunuşu da dahil) diğer bazı faktörlerin etkili olacağını göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan *Chlorella vulgaris*'e ait toplam amino asit miktarlarının yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında kantitatif olarak daha fazla olduğu görülmüştür (Richmond, 2004; Becker, 1994). Hasadı yapılan alglerden, HPLC cihazında aminoasit kompozisyonu ölçümü yapılmıştır (Şekil 4). Sonuçlara değerlendirildiğinde *Chlorella vulgaris*'te arjinin amino

asidinin bütün besiyerlerinde en fazla olduğu görülmüştür (Xie ve ark., 2017). Heterotrofik mikroalg örneklerinde en bol bulunan amino asit olan arjinin nitrik oksidin öncüsü ve antiaterojenik özelliklere sahip önemli bir vazodilatör olarak önemlidir (Taboada ve ark., 2010). Tüm besi ortamlarında en fazla miktar arjinine aittir. TAP besi ortamında %17.8, N-TAP besi ortamında %23.8. GÖL besi ortamında %5.8, MKEK besi ortamında %4.0'dır. Lezzet hissini ana bileşeni olan glutamik asit, en bol miktarda bulunan ikinci amino asittir (Bocanegra ve ark., 2009). TAP besi ortamında %10.4, N-TAP besi ortamında %9.4, GÖL besi ortamında %2.1'dir. Yüksek glutamik ve aspartik asit seviyeleri deniz yosunu ürünlerinin karakteristik özel aroma özelliklerinden sorumludur (Bocanegra ve ark., 2009), MKEK besi ortamında da glutamik asit (%1.6) ve aspartik asit (%1.9) %1.5-2.0 arasındadır. N-TAP ve MKEK besi ortamlarında histidin miktarında GÖL ve TAP besi ortamlarına bakıldığında çok az miktarda olduğu gözlenmiştir. N-TAP ve GÖL besi ortamında %0-3.5 arasında iken GÖL ve TAP besi ortamında %2-8.5 arasında seyrettiği gözlemlenmiştir. Tüm besi ortamlarında glisin en az yüzde de gözlemlenmiştir. Glisin değeri %0.1-2.5 arasında seyretmektedir.

5. Sonuç

- 1- Yerel olarak izole edilen *Chlorella vulgaris* türüne ait protein ve amino asit değerleri literatürde aynı türün farklı suşları için elde edilen sonuçlarla rekabet edebilecek düzeydedir ve üretim verimliliği potansiyeline sahiptir.
- 2- Denemesi yapılan atık su ve doğal göl sularının biyokütle açısından daha yüksek verimliliğe sahip olduğu ortaya çıkmaktadır.
- 3- Ancak, hedef makromolekül olan protein ve amino asitler açısından düşük değerler sergilemişlerdir. Bu durum, denemesi yapılan bu iki besi ortamının N ve P içerikleriyle yakından ilişkili olduğu düşünülmüştür.
- 4- Gerek P ve N ve gerekse diğer elementlerin optimizasyonu neticesinde hedef moleküllerin artışı sağlayacak araştırmaların planlanması ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma, Yüksek Lisans öğrencisi Merve Kavasbaşıoğlu'nun Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yürütmekte olduğu tez çalışmasından üretilmiştir. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından 2019/162 No'lu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Abdul Hamid N, Lim S. 2019. Evaluation of processing route alternatives for accessing the integration of algae-based biorefinery with palm oil mill. J Clean Prod. 212:1282-1299.

Ajala SO, Alexander ML. 2020. Assessment of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Oocystis minuta* for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in wastewater. Int J Energy Environ Eng. 11:311-326.

Angel AR, Mata L, Nys R, Paul NA. 2016. The Protein Content of Seaweeds: A Universal Nitrogen-to-protein Conversion Factor of Five. Chapter 2.

Angell AR. 2016. Seaweeds as an Alternative Crop for the Production of Protein. PhD Thesis, James Cook University. Jcu, Research online. Chapter 1.

Arora N, Patel AP, Pruthi A. 2016. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. Bioresour Technol. 213:79-87.

Aslan S, Kapdan I. K. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae, Ecol. Eng. 28: 64-70.

Becker EW. 1994. Microalgae - Biotechnology and Microbiology. Cambridge: Cambridge University Press.

Becker EW. 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnol. Adv, 25 (2): 207-10.

Bleakly S, Hayes M. 2017. Algal Proteins: Extraction, Application and Challenges Concerning Production. A Review. Foods, 6(5):33. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>.

Bocanegra A, Bastida S, Benedí J, Ródenas S, Sánchez-Muniz FJ. 2009. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. J Med Food. 12:236-258.

Brar A, Kumar M, Pareek N. 2019. Comparative Appraisal of Biomass Production, Remediation, and Bioenergy Generation Potential of Microalgae in Dairy Wastewater. Front. Microbiol. 10:678.

Cembella JA, Harrison PJ. 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part I. Crit Rev Microbiol. 10:317-391.

Cheng J, Lu H, Huang Y, Li K, Huang R, Zhou J, Cen K. 2016. Enhancing growth rate and lipid yield of *Chlorella* with nuclear irradiation under high salt and CO₂ stress. Bioresour Technol. 203:220-227.

Clemens P, Steven FC. 2016. Microalgae Biotechnology. Springer. ISBN 978-3-319-23808-1.

Delgado-Mirqueza F, Taidi P. 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. Biotechnol Rep. 11:18-26.

Jeffrey SW, Humphrey GF. 1975. New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen (BBP), Bd. 167:191-194.

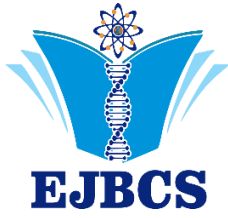
Kamalanathan M, Pierangelini M, Shearman LA, Gleadow R, Beardall J. 2015. Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. J Appl Phycol. 28:1509-1520.

Klok AJ, Martens DE, Wijffels RH, Lamers PP. 2013. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. Bioresour Technol. 134:233-243.

Lai J, Yu Z, Song X, Cao X, Han X. 2011. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 405: 6-17.

Li Y, Han D, Sommerfeld M, Hu Q. 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. Bioresour. Technol. 102:123-129.

- López CVG, García MCC, Fernández FGA, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JMF. 2010. Protein Measurements of Microalgal and Cyanobacterial Biomass. *Bioresour. Technol.* 101(19):7587-91.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu Q, Zhou W, Min M, Ma X., Ma Y., Chen P, Zheng H, Doan YTT, Liu H, Chen C, Urriola PE, Shurson GC, Ruan R. 2016. Mitigating Ammonia Nitrogen Deficiency in Dairy Wastewaters for Algae Cultivation. *Bioresour. Technol.* 201:33-40.
- Md. Asraful, Jing-Liang X, Zhongming W. 2020. *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Springer. ISBN 978-981-15-0169-2.
- Monfet, E, Unc A. 2017. Defining Wastewaters Used for Cultivation of Algae. *Algal Res.* 24:520–26.
- Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD. 2006. Dietary Reference Intakes (DRI). The Essential Guide to Nutrient Requirements. Institute of Medicine of The National Academies. Washington, D.C., pp. 144-156
- Richmond A. 2004 *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science.
- Saito JG, Ritt JT. 2008. Some thoughts on the concept of colimitation: three definitions and the importance of bioavailability. *Limnol Oceanogr.* 53(1):276-290.
- Santhakumaran K, Mathew JG, Ray L. 2020. Experimental evaluation of the culture parameters for optimum yield of lipids and other nutraceutically valuable compounds in *Chloroidium saccharophilum* (Kruger) comb. Nov. *Renewable Energy.* 147 (P1):1082-1097.
- Shelknanloymılan L, Atıcı T, Obalı O. 2012. Removal of nitrogen and phosphate by using *Chlorella vulgaris* on synthetic and organic materials waste water. *Biological Diversity and Conservation.* 5/2: 89-94.
- Solovchenko MV, Jablonowski N. 2016. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnol Adv.* 34(5):550-564.
- Su Y, Mennerich A, Urban M. 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture, *Water Res.* 45: 3351–3358.
- Taboada C, Millán R, Míguez I 2010. Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *J Sci Food Agric.* 90:445-449.
- Ullrich-Eberius C. 1973. Nitrat, Nitrit und Phosphat zur 1250 photosynthetischen Reduktion von Nitrat und Nitrit und zum ATP-Spiegel bei *Ankistrodesmus braunii*. *Planta.* 115:25-36.
- Vassilev S, Christina G. Vassileva CG. 2016. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application. An overview. *Fuel,* 181:1–33.
- Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R. 2010. Cultivation of green Algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162: 1174–1186.
- Xie T, Xia Y, Zeng Y, Li X, Zhang Y. 2017. Nitrate Concentration-Shift Cultivation to Enhance Protein Content of Heterotrophic Microalga *Chlorella vulgaris*: Over-Compensation Strategy. *Bioresour Technol.* 233:247-55.



Endemic fishes in transboundary river basins in Turkey

Özlem Ablak Gürbüz^{1*} 

¹Ankara Hacı Bayram Veli University, Polatlı Faculty of Science & Letters, Department of Biology
06900, Polatlı/Ankara, TURKEY

*Corresponding author : ozlem.gurbuz@hbv.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-7870-3396>

Received : 07/05/2020
Accepted : 06/12/2020

Abstract: Transboundary rivers flow between two or more countries. Turkey is located between two continents, Asia, and Europe. Five of Turkey's 25 river basins are transboundary named Maritsa, Orontes, Euphrates-Tigris, Kura-Araks and Coruh and spanning two continents and eight countries. All information on fish species distributed in the transboundary river basins in Turkey were gathered and presented in this study using published sources. 184 fish species in 25 families identified in transboundary river basins and 30 of them (16%) are endemic. The highest and lowest rate of endemism were found in Euphrates-Tigris and Maritsa basin, respectively. Most fish species in the area are threatened by human induced changes especially dams and habitat loss.

Keywords: Endemic fish species, transboundary river, Turkey

Türkiye’de sınıraşan nehir havzalarındaki endemik balıklar

Özet: Sınıraşan nehirler iki veya daha fazla ülke arasında akan nehirlerdir. Türkiye Asya ve Avrupa kıtaları arasında bulunmaktadır. Türkiye'nin 25 akarsu havzasının beşi; Meriç, Asi, Fırat-Dicle, Kura-Araks ve Çoruh iki kıta ve sekiz ülkeyi kapsamaktadır. Türkiye’de sınıraşan nehirlerde dağılım gösteren balık türleri ile ilgili bilgiler yayınlanmış kaynaklar kullanılarak sağlanmış ve bu çalışmada sunulmuştur. Sınıraşan nehir havzalarında tespit edilen 25 familyaya ait 184 balık türünden 30’u (%16) endemiktir. En yüksek ve en düşük endemizm oranı sırasıyla Fırat-Dicle ve Meriç havzalarında tespit edilmiştir. Bölgedeki balıkların çoğu özellikle baraj ve habitat kaybı gibi insan kaynaklı değişikliklerden dolayı tehdit altındadır.

Anahtar kelimeler: Endemik balık türü, sınıraşan nehir, Türkiye

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Turkey is located between Europe and Asia and divided into two main regions, Thrace, and Anatolia. Turkey has 25 river basins (DSI 2016) and each river basins shows different characteristic and have different flow regimes. Transboundary rivers are defined as waters that rise within the borders of a country and pass to another country's territory and flow between two or more countries. Five basins out of 25 river basins in Turkey are transboundary river basins as Maritsa (riparian states; Turkey, Bulgaria, Greece), Orontes (Turkey, Syria, Lebanon), Euphrates-Tigris (Turkey, Syria, Iraq), Kura-Araks (Turkey, Georgia, Iran, Azerbaijan, Armenia) and Coruh (Turkey,

Georgia) (Fig. 1). Transboundary rivers constitute 36% of Turkey's current water potential (DSI 2016).

The freshwater fish of Turkey has been studied for more than a century. The first taxonomic study on freshwater fish in Turkey was carried out by Abbot (1835). There are several researches on Turkish freshwater fishes' checklist (Kuru 2004; Geldiay and Balık 2007; Fricke et al. 2007; Kuru et al. 2014; Cicek et al. 2015). However, a nationwide inventory of endemic fish occurrences by all transboundary river basins has never been published. The purpose of this study is to identify endemic fish species living in transboundary river basins in Turkey and provide information about their current biological status.



Fig. 1. River basins in Turkey

2. Materials and Method

All available published sources were collected under the scope of this work in order to assess the current composition and characteristics of the endemic fish fauna of transboundary rivers in Turkey (Fricke et al. 2007; Geldiay and Balık 2007; Kuru et al. 2014; Cicek et al. 2015 and 2018). The further published studies related to transboundary basins and new fish records were also added to the scope of this study (Breil and Bohlen 2001; Bogutskaya et al. 2006; Turan et al. 2006 a-b; Erk'akan et al. 2007; Innal and Erk'akan 2006; Erk'akan et al. 2008; Van Neer et al. 2008; Turan et al. 2009; Birecikligil and Cicek 2010; Turan et al. 2011; Freyhof and Ozulug 2014; Kucuk et al. 2014; Turan et al. 2014a-b; Elp et al. 2015; Baycelebi et al. 2015; Cicek and Birecikligil 2016). Since there was limited information on Turkish part of Maritsa river, the study conducted by Economou et al. (2007) in Maritsa river, Greece as neighboring country was evaluated and used in this study. Valid names and authorities used by the authors were checked with the Fishbase (Froese and Pauly 2016). Fish species are grouped under their family names which are presented in taxonomical order follows Nelson (2006), species alphabetically within each family.

2.1. Study area

2.1.1. Maritsa (Meriç) Basin

The Maritsa River, whose catchment is shared by Bulgaria, Turkey, and Greece, is the longest river in the Balkan Peninsula forming a natural frontier of 240 km between Greece and Turkey. It rises in Bulgaria and flows along the Turkish-Greek border into the Aegean Sea. Having major tributaries named Arda and Tundja that mainly flow in Bulgaria, the river Erithropotamos flows in Bulgaria and Greece and the river Ergene that flows entirely in Turkish territory (UNECE 2007; Nikolaou et al. 2008).

2.1.2. Orontes (Asi) Basin

The Orontes River rises in the eastern part of the Beqaa Valley in Lebanon and flows into the Mediterranean Sea just south of Samandag, Turkey. The Orontes River is 556 km long, with 366 km in Syria, 98 km in Turkey and 40 km in Lebanon (Yildirim 2017). It is a northward-flowing river in the region and has two major tributaries, Afrin and Karasu join in former Amik Lake drained out for agriculture in the 1980s.

2.1.3. Euphrates-Tigris (Fırat-Dicle) Basin

The Euphrates River originates in the eastern highlands of Turkey, between Lake Van and the Black Sea, and is formed by two major tributaries, the Murat and the Karasu. There are numerous small tributaries of the Euphrates river basin in the mountains of Turkey, especially the Peri Suyu, Goksu and Tohma River. The Euphrates River is 3,000 km long (1,263 km in Turkey), divided between Turkey, Syria, and Iraq.

The Tigris River, also originating in eastern Turkey, flows through the east part of Turkey up to the border city of Cizre. It forms the border between Turkey and Syria, and Iraq and Syria. Its two major tributaries are the Great Zab and Lesser Zab and the following the Karasu, Kurucay, Batman, Botan, Garzan, Hezil, and Yenice Stream etc. The Tigris River is 1,850 km long, with 523 km in Turkey, 32 km on the border between Turkey and Syria and 1,418 km in Iraq.

2.1.4. Kura-Araks (Kura-Aras) Basin

The Kura River originates in the Kızılgedik Mountains in Ardahan province in northeast of Turkey and the Araks River originates in Erzurum province in eastern Turkey and has three major tributaries named as Arpacay, Karasu and Sarısu. The Kura-Araks basin is located in the South Caucasus with five separate countries named as Turkey, Iran, Armenia, Georgia, and Azerbaijan contributing area to the watershed. Kura and Araks both merge in Azerbaijan before entering the Caspian Sea.

2.1.5. Coruh (Çoruh) Basin

The Coruh River is located in north-east Turkey and shared by Turkey and Georgia. 91% basin area is located in Turkey while Georgia shares its 9%. The river originates in the western part of the Mescit mountains at Erzurum-Kars Plateau and flows to the Black Sea. The main tributaries of the Coruh River are the Tortum and Oltu rivers in Turkey. Coruh River is the fastest flowing river and is one of basins being exposed to the most erosion in Turkey (Akpınar et al. 2011; Sume et al. 2017).

3. Results and Discussion

184 fish species in 25 families occurred in five transboundary river basins in Turkey. A total of 30 species (16% of total fish species) was endemic in transboundary river basins in Turkey. Endemism rate and endemic fish species of each basin were shown in Fig. 2 and Table 1. The greatest number of endemic species was belonging to Cyprinidae family (13 species), followed by the Nemacheilidae (eight species), Salmonidae (six species) and Cobitidae (two species). Euphrates-Tigris basin had the highest endemism rate (18 species) following Orontes (four species), Coruh (four species) and Kura-Araks (three species) basins. Maritsa does not have any endemic fish species. *Crossocheilus caudomaculatus* is extinct in Orontes basin. Moreover, Büyük Menderes has the highest rate of endemism with 29 species among 25 river basins in Turkey following by Konya endorheic with 25 species. (Cicek et al. 2018).

Recent studies show that transboundary river basins in Turkey are under risk due to dam construction, habitat degradation and introduction of nonnative fish species (Fricke et al. 2007, Freyhof et al. 2014). Dam construction might cause habitat loss for some fishes because of disrupting habitat structure of rivers and force fishes living in lotic water to adapt to slower moving water. Dams especially multi-dam projects seriously block the movements of migratory fishes. Local economies might also negatively affect by dams due to river alterations and the presence of non-native fish species since, fishing is a livelihood for many residents along the transboundary river basin areas in Turkey. 15 fish species were determined as non-native in the transboundary river basins in Turkey and their risk to river basins increases due to direct and indirect negative effects on aquatic ecosystems (Fricke et al. 2007, Tarkan et al. 2015, Ablak-Gurbuz and Bonner 2020). Endemic fish species are very important part of a country's biodiversity. Endemic species are naturally found only in a certain region on the earth, so they are unique, and their distribution is limited. Therefore, threats to endemic fish species carry more risk of extinction than common species.

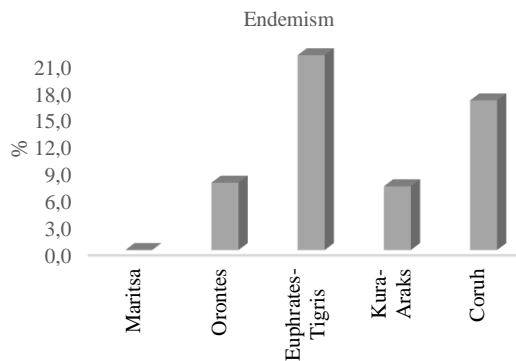


Fig. 2. Endemism of fish species in transboundary river basins

5. Conclusion

The species diversity in Turkey are quite high based on some factors for instance its geological and climatic characteristics and topographic structure. Transboundary river basins provide habitats for almost 50% of Turkey fishes. Fishes living in transboundary rivers can move forth and back between riverine countries, and any events that occurs in upstream country may affect downstream users. Most fishes such as lotic/non-guarders species and especially migrant fishes living in Turkey are threatened (Fricke et al. 2007; Freyhof et al. 2014) by several effects such as construction of dams and Hydroelectric Power Plants (HEPP), dewatering, habitat loss, pollution, destruction of fish spawning ground, introduction of foreign species, poaching while similar effects are happening in neighboring countries as well (Bobori and Economidis 2006; Economou et al. 2007; Coad 2010; Kibaroglu et al. 2011). To manage these valuable biodiversity, especially endemic, migrant, and lotic fishes should be monitored for, they are more prone to human-induced changes. It is essential to provide adequate flow

to support aquatic life downstream of the dams and to design science-based management strategies for providing fish communities' continued survival. Endemism rate of fish species is a significant factor for river health.

Table 1. Endemic fish species in each transboundary river basin (*Sources are given in parentheses as numbers)

Orontes	Euphrates-Tigris	Kura-Araks	Coruh
<i>Acanthobrama orontis</i> (1,2,3)	<i>Alburnoides diclensis</i> (28)	<i>Squalius turcicus</i> (1,18)	<i>Capoeta banarescui</i> (4,6,19,20)
<i>Barbus lorteti</i> (4, 6,7)	<i>Alburnoides emineae</i> (9)	<i>Oxynoemacheilus cyri</i> (4,6,7,18)	<i>Capoeta ekmekciae</i> (4,6,7,20,21)
<i>*Crossocheilus caudomaculatus</i> (4, 6)	<i>Alburnoides velioglui</i> (9)	<i>Oxynoemacheilus veyseli</i> (1)	<i>Salmo coruhensis</i> (20,22)
<i>Oxynoemacheilus namiri</i> (4, 5)	<i>Alburnus heckeli</i> (1,4,6,7,10)		<i>Salmo rizeensis</i> (20,22)
<i>Pseudophoxinus turani</i> (1, 24)	<i>Alburnus kurui</i> (1,4,6,7,10,23)		
	<i>Pseudophoxinus firati</i> (12)		
	<i>Cobitis elazigensis</i> (11,1)		
	<i>Cobitis kellei</i> (1,4,6,7,10)		
	<i>Oxynoemacheilus erdali</i> (13)		
	<i>Oxynoemacheilus hazarensis</i> (26)		
	<i>Oxynoemacheilus kaynaki</i> (14)		
	<i>Paraschistura chrysicristinae</i> (6, 29)		
	<i>Turcinoemacheilus kosswigi</i> (4,6,7,15)		
	<i>Salmo euphrataeus</i> (16)		
	<i>Salmo munzuricus</i> (27)		
	<i>Salmo okumusi</i> (16)		
	<i>Salmo tigridis</i> (17)		
	<i>Squalius semae</i> (25)		

*Sources: 1. Cicek et al. 2018; 2. Freyhof and Ozulug 2014; 3. Kucuk et al. 2014; 4. Cicek et al. 2015; 5. Birecikligil and Cicek 2010; 6. Fricke et al. 2007; 7. Kuru et al. 2014; 8. Van Neer et al. 2008; 9. Turan et al. 2014a; 10. Geldiay and Balik 2007; 11. Coad and Sarieyyüpoğlu 1988; 12. Bogutskaya et al. 2006; 13. Erk'akan et al. 2007; 14. Erk'akan et al. 2008; 15. Breil and Bohlen 2001; 16. Turan et al. 2014b; 17. Turan et al. 2011; 18. Cicek and Birecikligil 2016; 19. Turan et al. 2006 b; 20. Baycelebi et al. 2015; 21. Turan et al. 2006a; 22. Turan et al. 2009; 23. Freyhof et al. 2018; 24. Kucuk and Guclu 2014; 25. Turan et al. 2017a; 26. Freyhof and Ozulug 2017; 27. Turan et al. 2017b; 28. Turan et al. 2016; 29. Kottelat 2012)

*: Extinct species

Acknowledgements

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

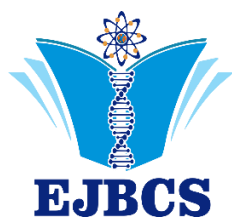
Conflict of interest disclosure:

There is no conflict of interest.

References

- Abbot KE 1835. Letter accompanying a collection from Trebizond and Erzeroun. Proceedings of the Zoological Society of London. Part III, pp. 89-92
- Ablak-Gurbuz O, Bonner TH 2020. Current assessment of species composition and biological characteristics of fishes in the transboundary rivers in Turkey. *PBSW* 133(1): 76–108 <https://doi.org/10.2988/19-00009>
- Akpınar A, Komurcu M I, Kankal M 2011. Development of hydropower energy in Turkey: The case of Coruh river basin. *Renew Sust Energ Rev* 15: 1201–1209
- Baycelebi E, Turan D, Japoshvili B 2015. Fish fauna of Coruh River and two first record for Turkey. *Turk J Fish Aquat Sci* 15: 783-794
- Birecikligil S, Cicek E 2010. Freshwater fish fauna of the rivers flow to Euphrates and Orontes rivers in Gaziantep. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 3(1): 115-123
- Bobori DC, Economidis PS 2006. Freshwater fishes of Greece: Their biodiversity, fisheries and habitats. *AQUAT ECOSYST HEALTH* 9(4): 407-418
- Bogutskaya NG, Kucuk F, Atalay MA 2006. A description of three new species of the genus *Pseudophoxinus* from Turkey (Teleostei: Cyprinidae: Leuciscinae). *Zoosyst Ross* 15: 335-341
- Breil M, Bohlen J 2001. First record of the loach fish *Turcinoemacheilus kosswigi* in the basin of Euphrates River, with first observations on habitat and behavior. *Zool Middle East* 23: 71-76
- Cicek E, Birecikligil S 2016. Ichthyofauna of the Turkish parts of Kura-Aras River Basin. *FishTaxa* 1: 14-26
- Cicek E, Birecikligil SS, Fricke R 2015. Freshwater fishes of Turkey: a revised and updated annotated checklist. *Biharian Biologist* 9(2): 141-157
- Cicek E, Fricke R, Sungur S, Eagderi S 2018. Endemic freshwater fishes of Turkey. *FishTaxa* 3(4): 1-39
- Coad BW, Sarıeyüpöğlü M 1988. *Cobitis elazigensis*, a new species of cobitid fish from Anatolia. *Jpn J Ichthyol* 34: 426-430
- Coad BW 2010. Freshwater fishes of Iraq. *Pensoft Series Faunistica*, No 93. Canadian Museum of Nature, Ottawa, Canada.
- DSI (General Directorate of State Hydraulic Works) 2016. Annual Report. Available at: <https://www.dsi.gov.tr/stratejik-planlama/faaliyet-raporlari>
- Economou AN, Giakoumi S, Vardakas L, Barbieri R, Stoumboudi M, Zogaris S 2007. The freshwater ichthyofauna of Greece—an update based on a hydrographic basin survey. *Mediterr Mar Sci* 8(1): 91-166
- Elp M, Sen F, Ozulug M 2015. *Alburnus selcuklui*, A New Species of Cyprinid Fish from East Anatolia, Turkey (Teleostei: Cyprinidae). *Turk J Fish Aquat Sc* 15: 181-186
- Erk'akan F, Nalbant TT, Ozeren SC 2007. Seven new fish species of *Barbatula*, three new species of *Schistura* and new species of *Sminemacheilus* (Ostariophysi: Balitoridae: Nemacheilinae) from Turkey. *J Fish Int* 2(1): 69-85
- Erk'akan F, Ozeren SC, Nalbant TT 2008. Two new species of Stone Loaches from Turkey (Teleostei: Nemacheilidae). *J Fish Int* 3 (4): 115-119
- Freyhof J, Ozulug M 2014. *Acanthobrama thisbeae*, a new species of bream from southern Anatolia, Turkey (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyol Explor Fres* 25(1): 1-10
- Freyhof J, Ekmekçi FG, Ali A, Khamees NR, Özüluğ M, Hamidan N, Küçük F, Smith KG 2014. Freshwater fishes. In: Smith KG, Barrios V, Darwall WRT, Numa C (eds) The status and distribution of freshwater biodiversity in the Eastern Mediterranean, Chapter 3, Cambridge, UK, Malaga, Spain and Gland, Switzerland: IUCN, pp. 19-42
- Freyhof J, Özüluğ M 2017. *Oxynoemacheilus hazarensis*, a new species from Lake Hazar in Turkey, with remarks on *O. euphraticus* (Teleostei: Nemacheilidae). *Zootaxa* 4247(4): 378-390
- Freyhof J, Kaya C, Baycelebi E, Geiger M, Turan D 2018. Generic assignment of *Leuciscus kurui* Bogutskaya from the upper Tigris drainage, and a replacement name for *Alburnus kurui* Mangit and Yerli (Teleostei: Leuciscidae). *Zootaxa* 4410(1): 113-135
- Fricke R, Bilecenoglu M, Sari HM 2007. Annotated checklist of fish and lamprey species (Gnathostomata and Petromyzontomorpha) of Turkey, including a Red List of threatened and declining species. *Stutt Beitr Naturkd Serie A* 706: 169
- Froese R, Pauly D (eds) 2016. Fishbase. World Wide Web electronic publication. Available at: www.fishbase.org
- Geldiay R, Balık S 2007. Türkiye Tatlısu Balıkları (Freshwater Fishes of Turkey). 5th edn. Ege University Press, Bornova, Izmir (in Turkish)
- Innal D, Erk'akan F 2006. Effects of exotic and translocated fish species in the inland waters of Turkey. *Rev Fish Biol Fisheries* 16:39–50
- Kankal M, Uzlu E 2014. The Status of Transboundary Rivers in Turkey. *Water Resources* 41(6): 649–665
- Kibaroglu A, Kramer A, Scheumann W (eds) 2011. Turkey's Water Policy. Springer, 426 pp.
- Kottelat M 2012. Conspectus Cobitidum: An inventory of the Loaches of the world (Teleostei: Cypriniformes: Cobitoidei). *Raffles Bull Zool* 26: 1–199
- Kucuk F, Bektas Y, Guclu SS, Kaya C 2014. The systematic position of *Acanthalburnus microlepis* (De Filippi, 1863) and contributions to the genus *Acanthobrama* (Cyprinidae: Leuciscinae) in Turkey. *Iran J Ichthyol* 1(2): 96-105.
- Küçük F, Güçlü SS 2014. A new *Pseudophoxinus* (Teleostei, Cyprinidae) species from Asi River Drainage (Turkey). *ZooKeys* 411: 57-66
- Kuru M 2004. Recent systematic status of inland water fishes of Turkey. *Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi* 24: 1-21
- Kuru M, Yerli SV, Mangit F, Unlu E, Alp A 2014. Fish biodiversity in inland waters of Turkey. *JADFA* 3: 93-120
- Nelson JS 2006. *Fishes of the World*. 4th edn. John Wiley and Sons, United States.

- Nikolaou AD, Meric S, Lekkas DF, Naddeo V, Belgiorno V, Groudev S, Tanik A 2008. Multi-parametric water quality monitoring approach according to the WFD application in Evros trans-boundary river basin: priority pollutants. *Desalination* 226: 306-320
- Sume V, Mete B, Ozener AY 2017. Yukarı Çoruh Havzasındaki Su Yapılarının Enerji Potansiyeli ve Çevresel Etkileşimi. *Türk Hidrolik Dergisi* 1 (1): 7-12
- Turan D, Kottelat M, Kirankaya SG, Engin S 2006a. *Capoeta ekmekciae*, a new species of cyprinid fish from northeastern Anatolia (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyol Explor Fres* 17(2): 147-156
- Tarkan AS, Marr SM, Ekmekci FG 2015. Non-native and translocated freshwater fish species in Turkey. *FiSHMED* 2015.003, 28 p
- Turan D, Kottelat M, Ekmekci FG, Imamoglu HO 2006b. A review of *Capoeta tinca*, with descriptions of two new species from Turkey (Teleostei: Cyprinidae). *Rev Suisse Zool* 113(2): 421-436
- Turan, D, Kottelat M, Engin S 2009. Two new species of trouts, resident and migratory, sympatric in streams of northern Anatolia (Salmoniformes: Salmonidae). *Ichthyol Explor Freshwaters* 20(4): 333-364
- Turan D, Kottelat M, Bektas Y 2011. *Salmo tigridis*, a new species of trout from the Tigris River, Turkey (Teleostei: Salmonidae). *Zootaxa* 2993: 23-33
- Turan D, Kaya C, Ekmekci FG, Dogan E 2014a; Three new species of *Alburnoides* (Teleostei: Cyprinidae) from Euphrates River, Eastern Anatolia, Turkey. *Zootaxa* 3754 (2): 101-116
- Turan D, Kottelat M, Engin S 2014b. Two new species of trouts from the Euphrates drainage, Turkey (Teleostei: Salmonidae). *Ichthyol Explor Freshwaters* 24(3): 275-287
- Turan D, Bektaş Y, Kaya C, Bayçeşlebi E 2016. *Alburnoides diclensis* (Actinopterygii: Cyprinidae), a new species of cyprinid fish from the upper Tigris River. *Zootaxa* 4067(1): 79-87
- Turan D, Kottelat M, Bayçeşlebi E 2017a. *Squalius semae*, a new species of chub from the Euphrates River, Eastern Anatolia (Teleostei: Cyprinidae). *Zool Middle East* 63(1): 33-42
- Turan D, Kottelat M, Kaya C 2017b. *Salmo munzuricus*, a new species of trout from the Euphrates River drainage, Turkey (Teleostei: Salmonidae). *Ichthyol Explor Freshwaters* 28(1):55-63
- UNECE (United Nations Economic Commission for Europe) 2007. Our waters: Joining hands across borders. First Assessment of Transboundary Rivers, Lakes and Groundwaters. Convention on the Protection and Use of Transboundary Watercourses and International Lakes. Economic Commission for Europe, United Nations Publications, Geneva. Available at <https://www.unece.org/env/water/>
- Van Neer W, Wildekamp R, Kucuk F, Unlusayin M 2008. The 1997-1999 surveys of the Anatolian fish fauna and their relevance to the interpretation of trade at Sagalassos. *Sagalassos VI, Geo- and Bio-Archaeology at Sagalassos and in its Territory*. Degryse P, Waelkens M (eds) Leuven University Press.
- Yildirim N 2017. An analysis on the name of the Asi River. *Archivum Anatolicum* 11(2): 77-88



Increased antibacterial activity of plant oils against foodborne pathogens through their encapsulation into chitosan based nanoparticles

Azime Yilmaz^{1*}, Meyrem Vehapi¹

¹ Yildiz Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Department of Bioengineering, Istanbul, Turkey

*Corresponding author : yilmaz@yildiz.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-9470-4310>

Received : 09/05/2020
Accepted : 06/12/2020

Abstract: Encapsulation of plant oils to increase their antimicrobial properties without losing their bioactive properties is a good strategy. Electro spraying technique is known to be one of the most efficient methods for the encapsulation process for this purpose. In this study, the conditions to fabricate nanoparticles were optimized by considering several characteristics of the nanoparticles such as the particle size using the electro spraying method. A mixture of *Origanum vulgare* L. essential oil and olive oil was encapsulated into a mixed polymer (poly vinyl alcohol/Chitosan; PVA-Chitosan) matrix, and the fabricated nanostructures were characterized. The plant oil loaded nanoparticles (PONPs) were also investigated in terms of their antimicrobial activity against different foodborne bacterial pathogens; namely, *Escherichia coli* ATCC 25150, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Their antibacterial activities were revealed by the agar disc diffusion method. As a result, PONPs had strong antimicrobial activity against all the tested pathogens. The PONPs showed the highest antibacterial activities against *L. monocytogenes* and *E. coli*, which was revealed by the higher inhibition zone values (15.83 and 11.60 mm, respectively). The results of this study suggest the use of electro spraying technique applied under the optimized conditions in this study as natural carriers to increase antibacterial activity of the plant oils.

Keywords: Increased antimicrobial activity, Nanoparticles, Electro spraying technique, *Origanum vulgare*, Olive oil

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Pathogens are disease causing microorganisms that include bacteria, fungi, parasites, and viruses. Pathogens can cause illness by their transmission to human through spoiled or contaminated food and water. Common symptoms of foodborne illnesses are gastrointestinal problems and vomiting; moreover, some of the more severe cases can result in premature death. Each year, foodborne pathogens such as; *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, and *Toxoplasma gondii* cause an average number changing from 3.3 million to 12.3 million cases of foodborne illness and up to 3.900 cases of deaths (Buzby and Roberts 1996).

Nowadays, the intensive use of antibiotics has led a wide range of foodborne pathogens develop a resistance against the drugs; for that reason, there is a need to research more effective antimicrobial agents (Rodríguez-Tobías et al. 2019). Some compounds from natural sources such as plants have been alternatively proposed as potential antimicrobial agents. Essential oil phenolic substances are

mainly responsible for antibiotic properties (Scandorieiro et al. 2016). Oregano is a class of medicinal and aromatic plants and the whole plant is used as an essential oil. Oregano essential oil is of great importance to the pharmaceutical, cosmetic and food industries. Essential oils consist of phytochemicals, monoterpenes, sesquiterpenes and their oxygen derivatives. These phytochemicals (thymol, anethol, menthol, carvacrol, phenolic acids, and flavones, etc.) show antimicrobial activity against bacteria (Yilmaz et al. 2016). Studies on the antibacterial mechanisms of oregano essential oil suggest that hydrophobic bioactive compounds cause damage to cell membrane, affect ATP production and protein synthesis, increase cell permeability, induce cytoplasmic changes and finally cause cell-death (Hyldgaard et al. 2012; Scandorieiro et al. 2016). In this respect, as compared to many other vegetable oils, olive oil has higher content of phenolic compounds and stronger antioxidant properties, which makes it more valuable than other vegetable oils (Sevim et al. 2016). Olive oil is always of special importance because it is a rich source of high

monounsaturated fatty acids (oleic acid) and antioxidants (E-vitamin and phenolic compounds). It is also an important oil in terms of its calcium, magnesium, iron and copper content. In addition, it includes provitamin A, vitamin C and thiamine in sufficient amounts (Yilmaz et al. 2016; Sevim et al. 2016). The content of bioactive components such as chlorophyll, carotenoid, tocopherols and phenolic compounds in olive oil varies according to its type and cultivation conditions, which affects the quality and antioxidant content of olive oil (Sevim et al. 2016).

Recently, nanostructures possessing the well known antimicrobial properties have been used as promising compounds in order to develop nanoparticles showing better antimicrobial performance than traditional antibiotics. For this reason, there is a trend to develop encapsulated essential oils with stronger antimicrobial properties (Rodríguez-Tobías et al. 2019). The influence of nanotechnology particularly on the healthcare industry is also substantial. Nanoparticles are used as natural or synthetic carriers for the delivery of drugs, growth factors, health supplements, and vitamins (Sridhar et al. 2015). There are several techniques that are presently used to develop such carriers, and electrospraying is one of these techniques that have been increasingly used in the recent years (Karakas et al. 2019). This method can be used for making polymer particles with nanometer scale diameters (Reneker and Chun 1996).

In order to increase the reliability, durability and nutritional value of food products, nanotechnology can be applied to improve the functionality of the bioactive materials by increasing their efficiency in terms of effective distribution of their functional components within the body (Chen et al. 2006a). For this purpose, nano sized food additives have been produced because nano additives are absorbed more easily and increase the shelf life of the product. Nanotechnology has also been used to develop formulation of functional food products. In this regard, food companies are working on the nano delivery system to increase the effectiveness of active ingredients such as vitamins and antioxidants. By using nano delivery systems, it is aimed at increasing control and efficacy of active ingredients (Gomez-Hens and Fernandez-Romero 2006). The food or food components which possess health benefits due to their preventive and therapeutic effects are defined as nutraceuticals or functional foods (Andlauer and Fürst 2002). The efficacy of nutraceuticals in the prevention of diseases depends on the preservation of the bioavailability of the active ingredient. Under normal conditions, the health benefits of the nutraceuticals may be impaired during food processing (light, temperature, and pH) or gastrointestinal system (pH and other nutrients), which leads to the decreased stability of the nutritional elements in food items, their reduced ability to remain in the stomach juice, and the poor permeability or solubility in the intestine. In order for the active ingredient to remain active until it reaches the physiological target in the organism, the ingredient should be in a protected structure in the system (Chen et al. 2006b). In this respect, their encapsulation within nanostructures such as nanoparticles

provides the protected structure. Encapsulation within nanoparticles is an efficient technique that offers superior properties than conventional encapsulation methods since the nanoparticles are small in size, which enables the active ingredient to be directly transferred to the circulatory system (Moraru et al. 2003).

Chitosan is a biodegradable and biocompatible biopolymer possessing various promising biological activities such as antibacterial, antifungal and antitumor effects. Hence, there has been a great number of studies to explore its potential applications in various industries. Chitosan has a potential application in several areas such as pharmaceuticals, food, biotechnology, and environment (Chung et al. 2004). Chitosan having antimicrobial activity can also be used to extend the storage life of foods by protecting them from attacks of foodborne pathogens. There have been recent extensive efforts to test the antimicrobial capacity of chitosan to protect food (Chung et al. 2003).

This study aims at increasing antibacterial activity of plant oils against foodborne pathogens through their encapsulation into chitosan based nanoparticles. For this purpose, the electrospraying method was used to fabricate nanoparticles to encapsulate a mixture of plant oils (MoPO), namely *Origanum vulgare* L. essential oil and olive oil. In brief, we first prepared this plant oil mixture loaded nanoparticles (PONPs), and then evaluate antibacterial activity of oil loaded nanoparticles against selected bacterial strain.

2. Materials and Method

2.1. Materials

Poly-vinyl alcohol and chitosan were procured from Merck (Merck, Darmstadt, Germany) and Sigma (Sigma-Aldrich, UK), respectively. Tween 20 was used as an emulsifier that was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, UK). Ethanol, methanol, Dimethyl sulfoxide (DMSO) and Nutrient agar (NA) were purchased from Merck (Merck, Darmstadt, Germany). *O. vulgare* was harvested from fields of Çumra Vocational School department of Plantal and Animal Production program of Medical and Aromatic Plants Research Center of Selçuk University, Konya, Turkey. The hydrodistillation method was used to extract essential oil from *O. vulgare*. Olive oil as the core material was obtained from Tariş, Turkey. In all experiments, deionization water was used.

2.2. Electrospraying Method

PVA-chitosan solution was prepared as follows, 0.4 gr PVA was dissolved in 24.5 mL distilled water and 0.1 gr chitosan was dissolved in 0.5 mL acetic acid at 70°C for 4 hours by stirring on a magnetic stirrer. After that, 1% (w/v) of the MoPO (mixture of 200 µL olive oil and 10 µL *O. vulgare*) and 1% (w/v) of Tween 20 were added and mixed to obtain a homogeneous solution (Fig.1). Holmarc Opto Mechatronics Pvt. Ltd. Nano Fiber Electrospraying Unit model no: HO-NFES-0434 electrospraying apparatus was used to fabricate mixture of plant oil nanoparticles (PONPs) by spraying method. The nanoparticles were

collected on a 10 cm collector plate at a rate of 0.3 mL/h. The electrical current was adjusted to 3 mA and the voltage to 19.8-20 kV (Karakas et al. 2019).

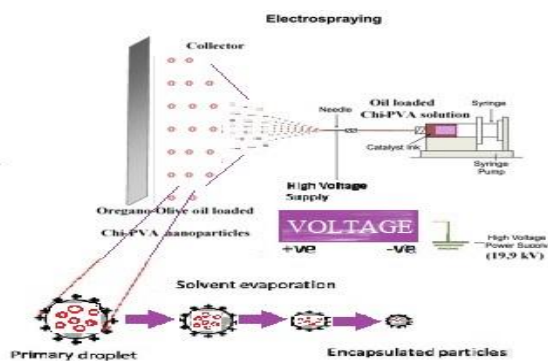


Fig. 1 The electro spraying system and experimental layout

2.3. Characterization of Nanoparticles

Particle diameters and polydispersity of PONPs were measured using a Zetasizer (Malvern Nano ZSP instrument, England). Quartz cuvettes were used during measurement. The surface morphology was revealed by images of scanning electron microscopy (SEM, Zeiss EVO ls-1, Germany) at a magnification of 25.00 K ×. The molecular structure was identified by FTIR (Thermoscientific Bruker Alpha model, Germany) to prove encapsulation.

2.4. Antibacterial Properties of Nanoparticles

Agar disk diffusion method was used to perform in vitro susceptibility tests for *Escherichia coli* ATCC 25150, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 strains. A blank disc impregnated with the 30µl volume of PONPs at different concentrations was placed on the agar plates to enable the antimicrobial substances to diffuse from the disc into the agar. The PONPs were prepared in DMSO at 10 mg mL⁻¹ concentration (Vehapi et al. 2018a). After that, the plate was inoculated with a standardized suspension of a microorganism and incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, the growth inhibition zones around the discs were measured (Sasidharan et al. 2010; Vehapi et al. 2018b). The diameter of the zone indicated the antimicrobial susceptibility of the test microorganism (Figure 2). The concentration of culture suspensions was adjusted to 10⁶ CFU/mL by PG Instruments T-60 Uv Visible Spectrophotometer device at 600 nm.

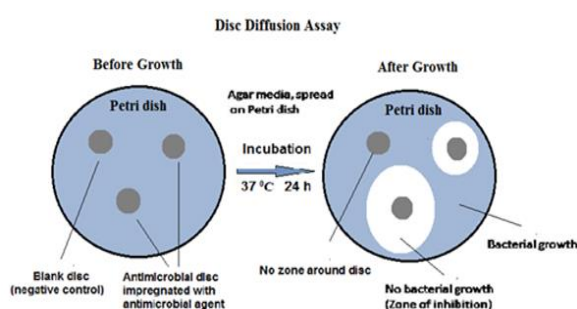


Fig. 2 A schematic design of agar disk diffusion assay

2.5. Statistical Methods

Analysis of variance was performed using the JMP (release 6.0.0, SAS) package program. The significance ratings between the averages were determined by Student's t test using the same package program. Data were presented as means with ± standard deviations (Correa et al. 2011; Natalie et al. 2017).

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Electro sprayed Nanoparticles (PONPs)

The diameters of the particles fabricated by the electro spray technique was investigated at different parameters. Particle diameters were measured using a Zetasizer instrument (Table 1). The particles were fabricated according to optimized parameters; namely, certain flow rate of the polymer solution, levels of voltage and current, and distance between the injection needle and the collector plate.

Table 1 Particle size and zeta potentials of PONPs.

Sample	Z- Ave	PDI	PK2 Mean Int. d:nm	PK2 Mean Int. d:nm	PK1 Area Int. percent	PK2 Area Int. percent
1	1196	0.94	428.7	72.52	86.6	13.4
2	1131	0.76	400.0	45.91	91.0	9.0

Morphology of blank NP0 and PONPs (Figure 3) were observed by SEM analysis. The PONPs were fabricated using the PVA-chitosan polymer solution. The average particle size of PONPs was determined to be 594.2 nm and the average particle size of blank nanoparticles was about 360 nm (Figure 3). It was observed that PONPs had higher particle size than did blank nanoparticles. Plant oil loaded nanoparticles PONPs were resulted in spherical shapes, and smooth surface structure.

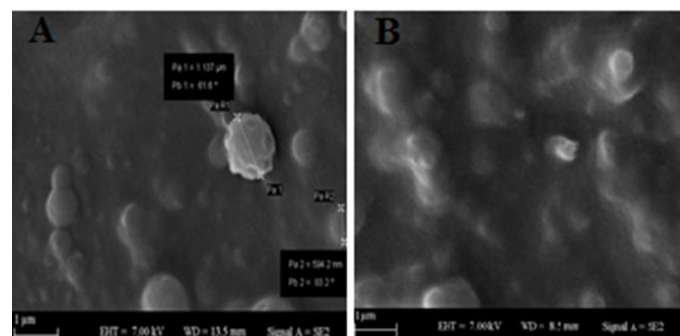


Fig. 3 SEM images of PONPs (A) and blank NP0 (B) nanoparticles at magnification of 25.00 Kx

The functional groups of PONPs were revealed by the FTIR analysis. The absorbance values of the functional groups present in the samples were determined in the wavelengths from 4000 to 600 cm⁻¹ (Figure 4). The FTIR spectra revealed characteristic peaks for C-H tension at

2800-2900 cm^{-1} , alkene tension at 1600-1700 cm^{-1} , C = O ester bond tension at 1700 cm^{-1} and ester C-O tension and C-N stretching at 1000-1200 cm^{-1} . These characteristic peaks were compared with those of PVA-Chitosan polymer solution and plant oil mixture.

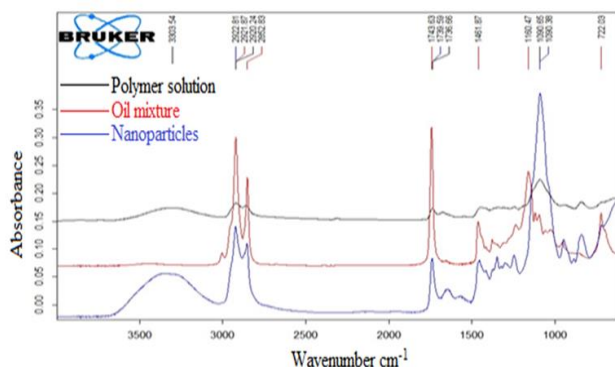


Fig. 4 FT-IR spectra of PONPs, plant oil mixture and polymer solution

The spectrum of PONPs was different from the spectra of plant oil mixture and polymer solution in terms of additional peaks belonging to plant oils, which indicated the oil mixture could be successfully encapsulated within the nanoparticles by electrospray technique.

3.1. Antibacterial Activity Against Foodborne Pathogens

Table 2 shows the size of inhibition zones (mm) formed against *E.coli*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, and *S. typhimurium* strains.

Table 2 Size of inhibition zone (mm) of PONPs, polymer solution, free plant oil and DMSO against foodborne pathogens

Sample	<i>E.coli</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>B.cereus</i>	<i>S.typhi</i>
PONPs	11.6 ± 0.4 ^{A,b}	15.8 ± 0.7 ^{A,a}	9.5 ± 0.7 ^{A,c}	9.0 ± 0.7 ^{A,c}
PVA-Chi	9.0 ± 0.0 ^{B,a}	9.0 ± 0.0 ^{B,a}	8.0 ± 0.0 ^{B,b}	8.0 ± 0.0 ^{B,b}
MoPO	9.0 ± 0.0 ^{B,a}	9.0 ± 0.0 ^{B,a}	8.0 ± 0.0 ^{B,b}	8.0 ± 0.0 ^{B,b}
DMSO	7.0 ± 0.0 ^{C,a}	No Zone	7.0 ± 0.0 ^{C,a}	No Zone

* Data were presented as means ± standard deviations (n=6) (p < 0.05). MoPO: Mixture of plant oils

A-C: Within each column, different superscript uppercase letters show differences between the treatments.

a-c: Within each row, different superscript lowercase letters show differences between the bacterial strains.

The disc diffusion assay results showed that PONPs exhibited stronger antibacterial activity against *L. monocytogenes* than other treatments. The size of inhibition zone formed by PONPs against *L. monocytogenes* was 15.83 ± 0.76 mm. On the other hand, these nanoparticles showed similar or lower antibacterial activity against *B. cereus* and *S. typhimurium*. The size of inhibition zone formed by PONPs against *B. cereus* and *S. typhimurium* were 9.50 ± 0.70 mm and 9.00 ± 0.70 mm, respectively. The size of inhibition zone formed by PONPs against *E. coli* was 11.60 ± 0.45 mm (Table 2). From Table 2, it is clear that free oil had lower antibacterial effects than the encapsulated oil, revealing that the antimicrobial

effectiveness of the plant oils could be increased by their encapsulation within the polymeric nanoparticles using the electrospraying technique.

4. Conclusion

Chitosan, essential oil and nanotechnology interactions may be potential strategies for controlling resistance evolution of foodborne pathogens. Our results highlight the powerful action of the plant oils encapsulated within PVA-chitosan polymer mix by electrospraying technique against Gram-negative and Gram-positive bacterial strains. In conclusion, the encapsulated plant oils resulted in synergistic and additive antimicrobial activities against foodborne pathogens such as *E. coli*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* and *S. typhimurium*. Therefore, the results of this study suggest that PONPs (plant oil loaded nanoparticles) would have a potential applications in cosmetics, food and pharmaceutical industry as well as clinical and hospital settings; i.e., for treating foodborne infections.

Acknowledgements

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

AZ: contributed to the supply of oils and the electrospraying process of nanoparticles.

MV: contributed to the characterization of nanoparticles and antimicrobial activity test.

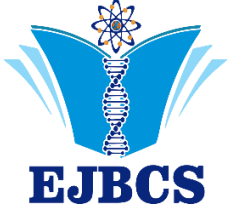
Conflict of interest disclosure:

There is no conflict of interest.

References

- Andlauer W, Fürst P. 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res Int* 35: 171-176.
- Buzby JC, Roberts T. 1996. ERS updates US foodborne disease costs for seven pathogens. *Food Rev/Natl Food Rev* 19(1482-2016-121439): 20-25.
- Chen H, Weiss J, Shahidi F. 2006a. Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technol* 60 (3): 30-36.
- Chen L, Remondetto GE, Subirade M. 2006b. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Sci Technol* 17(5): 272-283.
- Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JG, Lin JG. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 25(7): 932-936.
- Chung YC, Wang HL, Chen YM, Li SL. 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresour Technol* 88(3): 179-184.
- Correa H, Aristizabal F, Duque C, Kerr R. 2011. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterosins and seco-pseudopterosins isolated from the octocoral *Pseudopteroorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea). *Mar Drugs* 9: 334-344.

- Gomez-Hens A, Fernandez-Romero JM. 2006. Analytical methods for the control of liposomal deliver system. *TrAC Trends Anal Chem* 25: 167-178.
- Hyltdgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol* 3:12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
- Karakas CY, Sahin HT, Inan B, Özçimen D, Erginer YÖ. 2019. In vitro cytotoxic activity of microalgal extracts loaded nano-micro particles produced via electrospraying and microemulsion methods. *Biotechnol Progress* e 2876: 1-2. <https://doi.org/10.1002/btpr.2876>.
- Moraru C I, Panchapakesan C P, Huang Q, Takhistov P, Liu S, Kokini JL. 2003. Nanotechnology: A new frontier in food science understanding the special properties of materials of nanometer size will allow food scientists to design new, healthier, tastier, and safer foods. *Nanotechnol* 57(12): 24-29.
- Natalie PB, Bobbi LH, James JG. 2017. Endophytic root bacteria associated with the natural vegetation growing at the hydrocarbon-contaminated Bitumount Provincial Historic site. *Can J Microbiol* 63(6): 502-515. [dx.doi.org/10.1139/cjm-2017-0039](https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0039)
- Reneker DH, Chun I. 1996. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospraying. *Nanotechnol* 7(3) : 216.
- Rodríguez-Tobías H, Morales G, Grande D. 2019. Comprehensive review on electrospraying techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers. *Mater Sci Eng: C* 101:306-322
- Sasidharan S, Darah I, Noordin MKMJ. 2010. In vitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*. *New biotechnol* 27(4): 390-396
- Sevim D, Köseoğlu O, Çetin Ö. 2016. Bazı önemli zeytin çeşitlerinden elde edilen yağların minör bileşenlerinin ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Zeytin Bilimi* 6 (1): 1-7.
- Scandorieiro S, de Camargo L C, Lancheros CA, Yamada-Ogatta SF, Nakamura C V, de Oliveira AG, ... & Kobayashi RK. 2016. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Front microbial* 7: 760.
- Sridhar R, Lakshminarayanan R, Madhaiyan K, Barathi VA, Chin Lim KH, Ramakrishna S. 2015. Electrospayed nanoparticles and electrospun nanofibers based on natural materials: applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 44(3): 790-814.
- Vehapi M, Yılmaz A, Özçimen D. 2018a. Investigation of antibacterial and antioxidant activities of some algae species. *J Biotechnol* 280: S80.
- Vehapi M, Yılmaz A, Özçimen D. 2018b. Antifungal activities of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* microalgae cultivated in bold basal medium, wastewater and extract water against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Rom Biotechnol Lett* 1-8.
- Yılmaz A, Ermis E, Boyraz N. 2016. Investigation of in vitro and in vivo anti-fungal activities of different plant essential oils against postharvest apple rot diseases *Colletotrichum gleosporioides*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *J Food Saf Food Qual* 67: 113-148.



Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

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



Yaşlı sıçanlarda skopolamin kullanımının karaciğer dokuları üzerine morfolojik ve ultrayapısal etkilerinin değerlendirilmesi

Bükay Yenice Gürsu^{1*}, Elif Aksöz², Büşra Aslan², Betül Yılmaz Öztürk¹, İlnur Dağ¹

^{*1} Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ESOGÜ-ARUM), Eskişehir, Türkiye

²Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

*Corresponding author : bgursu@ogu.edu.tr
Orcid No : <https://orcid.org/0000-0002-6822-3484>

Received : 08/05/2020
Accepted : 06/12/2020

Özet: Skopolamin güçlü antikolinergik etkileri olan doğal bir bitki alkaloididir. Muskarinik reseptörleri rekabetçi bir şekilde inhibe eder ve hem periferik antimuskarinik etkiler, hem de merkezi sedatif, antiemetik ve amnezik etkiler üretir. Uzun yıllardır bulantı, hareket hastalığı, alerjik rinit, duodenal ülser hastalığı, gastrointestinal rahatsızlık ve spazm, fonksiyonel bağırsak sendromu ve hiperaktif mesane tedavisinde antiemetik, antisekretuar ve antispazmotik ajan olarak kullanılmaktadır. Skopolamin, karaciğer tarafından metabolize edilir, ancak genellikle sadece kısa süreler için düşük dozlarda (<1 mg) verilir. Karaciğer veya böbrek hastalığı olan hastalar skopolamini metabolize edemez veya idrarla atamazlar. Böyle durumlarda skopolamin kullanımı düşünülürken yan etkilerin artacağı kabul edilmelidir. Uzun yıllar boyunca yaygın olarak kullanılmasına rağmen, skopolamin karaciğer enzimi yükselmesi veya klinik olarak görünen karaciğer hasarı ile ilişkilendirilmemiştir. Bununla beraber kullanımı durumunda karaciğer dokularındaki etkilerine dair kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Karaciğer patolojisi çalışmalarında özellikle geçirimli elektron mikroskopisinin (TEM) önemli bir bileşen olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız skopolamin kullanımının karaciğerde herhangi bir değişime neden olup olmadığını ışık ve elektron mikroskopisi yardımı ile değerlendirebilmektir. Bu amaçla, 20 Wistar Albino erkek yaşlı sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar randomize olarak iki gruba ayrılmış ve Skopolamin HBr (Sigma), %0,9 salinde çözülerek hazırlanmıştır. Kontrol gruplarına 3 hafta süreyle 0.1 ml/kg oral gavaajla serum fizyolojik, deneylerden 30 dk önce intraperitoneal olarak 0.1 ml/kg serum fizyolojik verilmiştir. Deney gruplarına ise 3 hafta süreyle oral gavaajla 0.1 ml/kg serum fizyolojik, deneylerden 30 dk önce intraperitoneal olarak 1mg/kg skopolamin uygulanmıştır. Süre bitiminde hayvanlardan anestezi altında 1mm³ boyutlarında karaciğer örnekleri alınmış ve dekapitasyon uygulanmıştır. Fiksasyon prosedürünün ardından örnekler ışık ve elektron mikroskopik takip işlemleri yapılmıştır. Elde edilen bloklardan ultramikrotomla alınan yarı ince kesitler ışık mikroskopisi ile, tam ince kesitler ise boyandıktan sonra TEM (Hitachi HT 7800) ile incelenmiştir. Bulgularımız skopolamin kullanımının karaciğerde ışık ve elektron mikroskopik düzeyde önemli bir farklılığa neden olmadığını, ancak skopolamin kullanılan grubun bazı örneklerinde kofül artışının tespit edildiğini göstermektedir. Ancak hepatosit bütünlüğü, şekli ve genel doku morfolojisinin iyi korunduğu gözlenmiştir. Bununla beraber verilerimizin ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, Skopolamin, Geçirimli Elektron Mikroskopisi

Evaluation of the morphological and ultrastructural effects of on liver tissues of scopolamine use in old rats

Abstract: Scopolamine is a natural plant alkaloid with strong anticholinergic effects. It competitively inhibits muscarinic receptors and produces both peripheral antimuscarinic effects and central sedative, antiemetic and amnesic effects. It has been used as an antiemetic, antisecretory and antispasmodic agent in the treatment of nausea, motion sickness, allergic rhinitis, duodenal ulcer disease, gastrointestinal discomfort and spasm, functional bowel syndrome and hyperactive bladder for many years. Scopolamine is metabolized by the liver, but is usually given in low doses (<1 mg) only for short periods of time. Patients with liver or kidney disease cannot metabolize scopolamine or excrete it in the urine. In such cases, it should be accepted that side effects will increase when considering the use of scopolamine. Although widely used for many years, scopolamine has not been associated with elevated liver enzyme or clinically apparent liver damage. However, there is limited study on its effects on liver tissues if used. Transmission electron microscopy (TEM) is considered to be an important component in liver pathology studies.

Our aim in this study is to evaluate whether scopolamine use causes any changes in the liver with the help of light and electron microscopy. For this purpose, 20 Wistar Albino male old rats were used. Rats were randomly divided into two groups and Scopolamine HBr (Sigma) was prepared by dissolving in 0.9% saline. The control groups were given saline with 0.1 ml / kg oral gavage for 3 weeks, and 0.1 ml / kg saline intraperitoneally 30 minutes before the experiments. In the experimental groups, 0.1 ml / kg saline was administered with oral gavage for 3 weeks and 1 mg / kg scopolamine intraperitoneally was administered 30 minutes before the experiments. At the end of the period, 1mm3 sized liver samples were taken from animals under anesthesia and decapitation was performed. After the fixation procedure light and electronmicroscopic preparation procedures were performed. Semi-thin sections taken by ultramicrotome from the obtained blocks were examined by light microscopy, and after the thin sections were stained with TEM (Hitachi HT 7800). Our findings show that the use of scopolamine does not cause a significant difference in light and electron microscopic levels in the liver, but the vacuol formation increase was detected in some samples of the scopolamine group. However, hepatocyte integrity, shape and general tissue morphology were well preserved. However, our data should be supported by detailed studies.

Keywords: Liver, Scopolamine, Transmission Electron Microscopy

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Skopolamin, deneysel hayvan çalışmalarında amnezik etkiler üreten muskarinik kolinerjik bir reseptör antagonistidir. *Solanaceous* türü çeşitli bitkilerden ekstrakte edilebilmekte ya da sentetik olarak üretilmektedir (Khosravi-Farsani ve ark., 2016; Luetje ve Wooten, 1996). Ampirik formülü $C_{17}H_{21}NO_4$ tür ve yapısal formülü bir üçüncül amin L- (2) –skopolamin’dir (skopinli tropik asit ester; MW = 303.4) (Antor ve ark., 2014). Yaşlanmayla birlikte artan oranda gözlenen Alzheimer hastalığı ve demans, beyinde bilişsel fonksiyonlarda önemli rolü olan kolinerjik sistemdeki kayıplarla karakterizedir (Auld DS ve ark., 2002). Skopolamin, kolinerjik nöronların nonspesifik antagonistidir. Kolinerjik nöronlardaki iletiyi engelleyerek deney hayvanlarında öğrenmeyi ve hafızayı bozar. Bu nedenle, hafıza deneylerinde Alzheimer benzeri model oluşturmak için çok yaygın kullanılmaktadır (Klinkenberg I ve Blokland A, 2010).

Skopolamin, klinikte opioid bağımlılığı gibi merkezi sistemi ile ilgili rahatsızlıklar için tedavi edici olarak ya da araç tutması durumlarında kullanılmaktadır. Anestezi öncesi ön tedavi ve antiemetik etkiler için de çok uygun bir ilaçtır (Palle ve Neerati, 2017; Zaki ve ark., 2014).

Skopolaminin farmakokinetik parametreleri dozaj formuna bağlı olarak değişiklik göstermekte olup, oral uygulamalardaki biyoyararlanımı sınırlıdır. Plazmadaki yarı ömrünün kısa olmasının yanı sıra halüsinasyon görme, vertigo, ağız kuruluğu ya da uyuklama gibi doz bağımlı yan etkileri bulunmasından dolayı, klinikte skopolaminin oral ya da parenteral kullanımı sınırlıdır. Geliştirilmiş olan transdermal dozaj formu yüksek insidanslı yan etkileri azaltmayı hedeflemektedir (Renner ve ark., 2005). Ancak transdermal skopolaminin uzun süre kullanımı da ilaçla ilgili bir bağımlılık yapabilmektedir. Bu sebeple ilaç genellikle sadece kısa süre için ve düşük dozlarda (<1 mg) uygulanmaktadır (LiverTox, 2017). Bulantı, kusma ya da baş ağrısı en yaygın gözlenen semptomlardır ve şiddetli vakalarda hastanede kalmayı gerektirebilir. Bu sebeple hekimlerin ilaçla ilgili farmasötik talimatları dikkatlice ele almaları gerekmektedir (Luetje ve Wooten, 1996).

Skopolamin, absorpsiyon sonrası hepatik metabolizmaya uğramakta ve daha sonra idrarla dışarı atılmaktadır.

Karaciğer, vücuttaki metabolizma ile ilgili ana organdır ve eşsiz bir kan dolaşımının yanı sıra benzersiz bir mikro damar sistemine sahiptir. Çeşitli gastrointestinal bileşenler, toksinler ya da enfeksiyöz ajanları taşıyabilen kan, karaciğere sinüzoidler yoluyla geçmektedir. Sinüzoidal hücreler bazı savunma mekanizmaları ile bu bileşenlerle reaksiyona girerek tahriş edici etkilerin en aza indirgenmesine çalışırlar (Wisse ve ark; 1996; Nafady ve ark., 2017).

Karaciğerin elektron mikroskopik incelemesi komplike, zaman alıcı ve uzmanlık gerektiren bir çalışmadır. Hem karaciğerin ince yapısının iyi analiz edilmesi ve hem de analiz süreci boyunca tespit, gömme, kesit alma, kontrastlama için boyama ve mikroskopik incelemede karşılaşılabilecek çeşitli artefaktlar konusunda iyi bir deneyimin olması gerekmektedir (Wisse ve ark., 2010). Biyomedikal araştırmalarda geçirirli elektron mikroskopik veriler (TEM) çok değerlidir ve doğru preparasyon yönteminin seçimi sonucu doğrudan etkilemektedir.

Yaygın kullanımına rağmen, skopolaminin karaciğer enzimi yükselmesine yol açtığı ya da klinik karaciğer hasarı ile ilişkilendirilmesi durumu nadirdir. Yapılan bir çalışmada skopolaminin sıçan karaciğer dokularında doz bağımlı antioksidan ve antiplikasyon aktiviteri rapor edilmiş ve bu durum reaktif oksijen türlerinin artışı ile açıklanmıştır (Khosravi-Farsani ve ark., 2016). Bununla beraber kullanımı durumunda karaciğer dokularındaki morfolojik ve ultrayapısal etkilerine dair sınırlı çalışma bulunmaktadır. Skopolamin deney hayvanı çalışmalarında da hafızanın değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmakta, fakat bu çalışmalar daha çok beyine odaklandığından karaciğerdeki etkileri araştırılmamaktadır. Çalışmamızda skopolamin kullanımının karaciğer dokusunda herhangi bir morfolojik ve ultrayapısal değişime neden olup olmadığını ışık ve geçirirli elektron mikroskopi yardımı ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metod

Çalışma ile ilgili 2020/3-7 nolu etik onay Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyle Yerel Etik Kurulu tarafından verilmiş olup çalışmanın deney hayvanları ile ilgili aşamaları Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde

(BAUN-DEHAM), 1 gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın inceleme ve görüntüleme basamakları ise Eskişehir Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ARUM) çalışılmıştır.

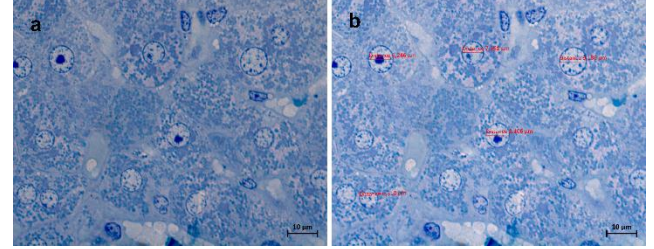
2.1. Deney Protokolü

Bu çalışmada 20 Wistar Albino erkek yaşlı sıçan (21-22 aylık) kullanılmıştır. Çalışmanın kurgulanmasında skopolamine bağlı hafıza bozukluğu modeli temel alınmıştır. Hayvanlar, kontrol grubu ve ilaç uygulama grubu olarak raslantısal iki gruba ayrılmıştır. Bu çalışmada kullanılan ilaç grubuna verilecek etken madde olan Skopolamin HBr (Sigma), %0,9 salinde çözülerek hazırlanmıştır. 3 haftalık bir zaman dilimi için kontrol gruplarına 0.1 ml/kg oral gavajla serum fizyolojik verilmiş ve son hafta davranış deneyinden yarım saat önce intraperitoneal olarak 0.1 ml/kg serum fizyolojik uygulaması gerçekleştirilmiştir. İlaç uygulanan deney gruplarına ise 3 hafta süreyle oral gavajla 0.1 ml/kg serum fizyolojik, deneylerden 30 dk önce intraperitoneal olarak 1mg/kg skopolamin uygulanmıştır. Hayvanlardan ketamin/ksilazin anestezisi altında 1mm³ boyutlarında karaciğer örnekleri alınmış ve dekapitasyon uygulanmıştır. Dokular vakit kaybetmeden 0.1 M fosfat tamponunda hazırlanan %2.5'lük glutaraldehit solusyonuna alınarak birincil fiksasyonları 24 saat 4°C'de gerçekleştirilmiştir. 15 dakikalık PBS tamponla 3 kez yıkanarak fiksatif ortamdan uzaklaştırılmış ve 2 saat boyunca %1'lik osmiyum tetroksit ile ikincil fiksasyon uygulanmıştır. Dokular aynı şekilde PBS yıkama serisi ile fiksatiften arındırılmıştır. Dokulara 15 dk 2 kez alkol serileri uygulanarak dehidrasyonu (%30, %50, %70, %90, %96, %100) gerçekleştirilmiştir. 30 dk. süre ile 2 kez Propilen oksit ile şeffaflaştırılan dokular propilen oksit- araldit karışımında 2 saat bekletilmiştir ardından 1 gece boyunca saf araldit içerisinde inkube edilmiştir. Daha sonra resin bloklar içinde polimerize olan dokular ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için ultramikrotom (Leica Ultracut R) cihazı ile yarı ince (700 nm) ve tam ince kesitleri (60 nm) alınmıştır. Işık mikroskobu incelemeleri için kesitler toluidin mavisiyle boyanmıştır. Elektron mikroskopik incelemeler(Hitachi HT 7800) için kesitler bakır gridler üzerinde uranil asetat-kurşun sitrat ile boyanmıştır.

3. Bulgular

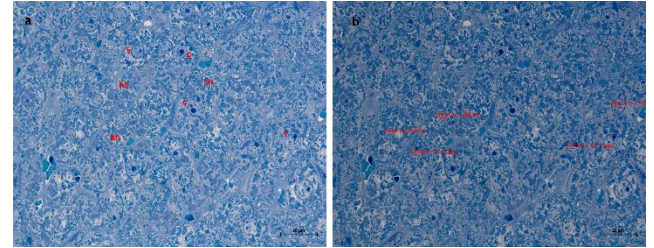
Çalışmamızda incelenen karaciğer biyopsi örnekleri, kontrol ve skopolamin uygulanan gruplardan elde edilen ışık ve elektron mikroskopik verilere göre morfolojik ve ultrayapısal açıdan değerlendirilmiştir. Şekil 1a, kontrol grubundan elde edilen karaciğer örneklerinde normal histolojik yapıyı göstermektedir. Hepatositler düzenli yuvarlak ve oval görünümde olup, çekirdekçik yapıları gözlenmektedir. Stoplazmik dağılım homojendir ve hücreler arası bağlantılar düzenlidir, Kupfer hücreleri sağlıklıdır (Şekil 1 a).

Daha sonra ışık mikroskop verilerinde gözlenen hepatosit çekirdeklerinin çap ölçümleri yapılmıştır (ZEISS AXIOIMAGER M1). Bu amaçla her kesitten rastgele en az beş farklı bölge seçilmiş ve toplam 50 çekirdek çapı ölçülerek, elde edilen değerlerin ortalaması hesaplanmıştır. Kontrol grubu hepatosit çekirdeği çapları ortalama olarak 7.85 µm olarak belirlenmiştir (Şekil 1b).



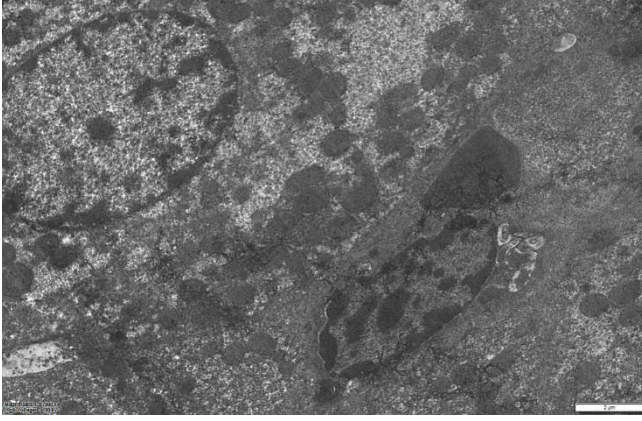
Şekil 1a. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitlerden elde edilen kontrol grubu sıçan karaciğerinin ışık mikroskopik görüntüsü b. Ortalama hepatosit çap ölçüm işlemlerinde değerlendirilen bir alana ait temsilci resim. Skala bar, 10 µm.

Skopolamin uygulanan örneklerden elde edilen yarı ince kesitlerde ise hepatosit görünüşleri genel olarak kontrol grubundakilere benzerlik göstermektedir. Çekirdek yapıları yuvarlak ve oval görünümde olup, çekirdekçik çoğunda net olarak gözlenmektedir. Sinüzoidal alanlar normal görünümündedir. Az sayıda hepatosit yapısında stoplazma homojenitesinin azaldığı gözlenmektedir (Şekil 2a). Bu gruptan elde edilen ortalama hepatosit çekirdek çap ölçümleri ise 6.70 µm'dir (Şekil 2b).



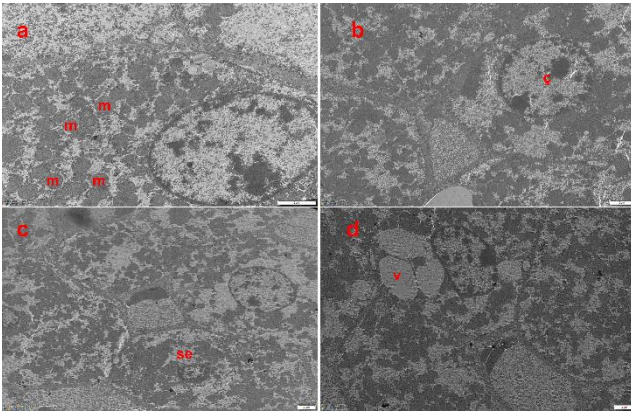
Şekil 2a. Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitlerden elde edilen ve skopolamin uygulanan sıçan karaciğerinin ışık mikroskopik görüntüsü; yuvarlak-oval yapıya hepatosit çekirdekleri, normal görünümlü kupfer hücreleri ve sinüzoidal alanlar, bazı bölgelerde stoplazmik erimeler b. Ortalama hepatosit çap ölçüm işlemlerinde değerlendirilen bir alana ait temsilci resim. Skala bar, 20 µm.

Kontrol karaciğer örneklerinden elde edilen tam ince kesitlerde normal hepatosit yapısı gözlenmiştir. Çekirdek belirgin bir çift zara sahiptir ve sağlıklı ultrayapısal görünümündedir. Nükleoplazma ökromatik görünümündedir. Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi stoplazmik organeller bütünlük göstermektedir; mitokondri küresel ya da ovoid şekillerde olup bol ve düzenli bir yapıdadır. Kupfer hücre görünümü normaldir (Şekil 3a).



Şekil 3a. Kontrol grubu sıçan karaciğer dokularından TEM ile elde edilen ultrayapısal bulgulara ait temsilci görüntü; düzenli hepatosit yapısı, çekirdek zarı sağlıklı, stoplazma ökromatik görünümde, bol miktarda ve düzenli mitokondri ve ER yapıları. Skala bar 2 µm.

Skopolamin uygulanan örneklerden elde edilen TEM mikrograflarında ise çekirdek kontrole benzer sağlıklı morfolojide olup yuvarlak ya da ovoid şekilli ve ökromatik görünümündedir. Az sayıda yağ damlacıkları gözlenmiştir. Mitokondriler bol ve normal görünümündedir. Hücreler arası bağlantılar düzenlidir ve mitokondri yakınlığında ER'lar gözlenmiştir. Ancak stoplazmada yer yer erimeler olduğu görülmüştür. Az sayıda Kupfer hücresi ya da hepatosit çekirdeği yanında koful benzeri veziküller gözlenmiştir. Disse aralığı normal görünümündedir. Ancak bazı hepatosit çekirdeklerinin kontrole göre daha küçük bir görünümde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4 a-b-c-d).



Şekil 4a-b-c-d. Skopolamin uygulanan sıçan karaciğer dokularından TEM ile elde edilen ultrayapısal bulgulara ait temsilci görüntü; çekirdek (ç) kontrole benzer sağlıklı morfoloji ve ökromatik görünümde, mitokondriler (m) bol ve düzenli yapıda ve hücreler arası bağlantılar normal görünümündedir. Yer yer yağ damlacıkları, yer yer tek tek ya da kümeler halinde gözlenen koful benzeri stoplazmik veziküllerin (v) yanı sıra stoplazmik erimelerde (se) dikkat çekmektedir. Skala bar 2 µm.

4. Tartışma

Skopolamin doğal bir antimuskarinik ajan olup çok uzun yıllardır araç tutması ile ilişkili bulantı ve kusmayı önlemede kullanılmaktadır (Wei ve ark., 2016). Merkezi sinir sisteminin kusma merkezindeki kolinerjik geçişi bloklayarak etkisini gösterir (Sandlin, 2002). Ayrıca gastrointestinal sekresyonları ve motiliteyi azaltarak tükrük ve teri inhibe etmektedir (Sanchez ve Lusk, 2015).

Bu çalışmada skopolamin kullanımının sıçan karaciğer dokularındaki morfolojik ve ultrayapısal etkileri araştırılmıştır. Literatürde bilgimize göre skopolaminin direk karaciğer dokuları üzerine histolojik etkilerinin araştırılmasından ziyade skopolamin ile indüklenmiş çeşitli bozukluklar durumunda gözlenen etkiler rapor edilmektedir. Örneğin skopolamin uygulanması Alzheimer hastalığının fizyofarmakolojik bir modeli olarak da kabul edilmektedir (Bajo ve ark., 2015). Bu sebeple de farklı kognitif fonksiyonlar üzerine etkisi oldukça yoğun olarak araştırılmıştır (Jeong ve ark., 2008). El-Marashy ve arkadaşları ratlarda skopolamin ile indüklenmiş demans durumunda, silymarinin iyileştirici etkilerini obje tanıma testi kullanarak göstermişlerdir. Yazarlar bu etkinin kolinerjik etkinin artırılması, antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteler ile olduğu kadar, beyin nörotransmitterlerinin yavaşlaması (azalması) ya da histopatolojik değişimlerle de sağlanmış olabileceğini belirtmişlerdir (El-Marashy ve ark., 2018). Chen ve arkadaşları skopolaminin amyloid beta birikimi, oksidatif stres, sinaptik bozulmalar, hafıza ve öğrenme kusurları gibi olayları indükleyebildiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar skopolamin ile indüklenmiş ratlarda 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF)'un koruyucu etkilerini araştırmışlar ve sonuç olarak 7,8-DHF'un skopolamin indüklü Alzheimer hastalığı gibi patolojik bozuklukların azaltılmasında ümit verici bir ajan olabileceğini belirtmişlerdir (Chen ve ark., 2014).

Bir çalışmada, skopolamin, siproheptadin ve kediotu kombinasyonundan oluşan, reçetesiz satılan bir uyku ilacını aşırı dozda alan 23 hastada, uyuşukluk ve kafa karışıklığı gibi semptomlar gözlenmiş; fakat hiçbir hastada karaciğer hasarı veya alanin amino transferaz (ALT) yüksekliği gelişmemiş ve hepsi 1-6 gün içinde iyileşmiştir (Chan ve ark., 1995). Burada gözlenen karaciğer hasarının kullanılan kombinasyonun içindeki başka ilaçlara bağlı olması muhtemeldir. Yapılan iki ayrı sistematik derlemede postoperatif bulantı ve kusmanın önlenmesi için kullanılan transdermal skopolaminin güvenliği değerlendirilmiş, fakat hepatotoksisiteden ya da enzim yüksekliğinden bahsedilmemiştir (Kranke ve ar., 2005; Apfel ve ark., 2010). Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızla da uyumlu niteliktedir. Karaciğerde toksisite bulunuşunu doğrulayabilmek için histolojik tayinlerin yapılması büyük önem taşımaktadır. Sabullah ve arkadaşları TEM kullanarak *Puntius javanicus* karaciğeri üzerine CuSO_4 'ın kimyasal etkileri ile oluşabilecek in vivo stresi araştırmışlardır. Yazarlar bakırın özellikle hepatosit ultrayapısı üzerine önemli etkileri olduğunu belirterek, çekirdek şeklindeki anormallikler, çekirdek membranında hasarlar, şişmiş hücreler ve yağ damlacıkları birikimini rapor etmişlerdir. CuSO_4 maruziyeti artırıldığında ise piknotik çekirdek oluşumu ile mitokondri gibi organellerde hasarlar olduğu tespit edilmiştir. Golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum yapısında çözümler gözlenmiştir (Sabullah ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda da karaciğer patolojisinin incelenmesinde hepatosit yapısı, çekirdek, mitokondri ve endoplazmik retikulum yapısı, hücreler arası bütünlük ve stoplazmik homojenite gibi faktörler ele alınmıştır. Verilerimiz skopolamin uygulanan örneklerde kontrol örneklerine göre hepatosit, çekirdek ve çekirdekçik yapıları

morfolojik açıdan genel olarak iyi korunmuştur. Ancak bazı hücrelerde stoplazmada yer yer erimeler görülmüş ve hepatosit çekirdek çaplarında bir miktar küçülme izlenmiştir. TEM verilerimiz ise hem kontrol grubu ve hem de skopolamin uygulanan gruplarda hepatosit çekirdeğinin normal oval-yuvarlak ve düzenli çift zar yapısını koruduğunu, ancak bazı çekirdeklerde boyut küçülmesi olduğunu desteklemiştir. Diğer yandan mitokondri ve ER görünüşleri normal olmakla beraber yer yer koful benzeri vezikül oluşumları ve stoplazmik erimelere de rastlanmıştır.

Çekirdek yapısının ultrayapısal düzeyde incelenmesi apoptoz çalışmalarında temel faktörlerden biridir. Yeh ve arkadaşları, oküler yüzey apoptozu üzerine deneysel kuru gözün etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada skopolamin gözyaşı üretiminin inhibisyonu için sistemik olarak kullanılmıştır. Yazarlar TEM bulgularını araştırırken özellikle çekirdekteki morfolojik değişimleri değerlendirmişler ve konjunktivital epitelyal hücrelerde apoptozla tutarlı ultrayapısal morfolojik değişimleri rapor etmişlerdir (Yeh ve ark., 2003).

Çeşitli ilaçlar ya da endotoksin gibi bileşenler sistematik olarak ya da barsak emilimi sonrası karaciğere ulaşabilmektedir. Bu yüzden sinüzoidal duvarı kaplayan hücreler, kan bileşenleri parankimal hücrelerle temas etmeden önceki son engeldir. Nafady ve arkadaşları *Escherichia coli* endotoksini ve asetaminofen tedavisi sonrası sinüzoidal duvarı oluşturan hücreleri incelemişlerdir. Yazarlar her iki ilaç uygulama grubunda da fenestra daralması ile sinüzoidal epitelyal hücrelerde şişmeler olduğunu, kupfer hücreleri ile kronik satellat hücrelerde aktivasyon olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca hepatik stellat hücreleri çevreleyen ve disse boşluğunda büyük miktarlarda kollajen lifleri görülmüştür (Nafady ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda temel alınan inceleme kriterleri hepatosit yapısı, organeller ve genel doku bütünlüğü olmakla beraber, sinüzoidal hücreler ve Kupfer hücrelerinde önemli bir hasar bulunmuş gözlenmiştir.

5. Sonuç

Çalışmamızda sıçan karaciğer dokularında skopolamin kullanımına bağlı ileri derecede bir histolojik hasar gözlenmemekle beraber, ilaç verilen gruplarda yer yer koful benzeri veziküllerin oluşumu, stoplazmik erimeler bulunmuş ve çekirdek çaplarında az da olsa kantitatif bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak verilerimizin ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

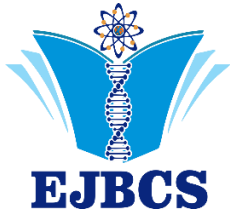
Teşekkür Bu çalışmanın, Deneysel hayvanlarına ilaç uygulanması aşaması Balıkesir Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (BAUN-DEHAM), Işık ve Elektronik mikroskopik incelemeleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ARUM) yapılmıştır.

Kaynaklar

Antor MA, Uribe AA, Ermey-Falcon N, Werner JG, Candiotti KA, Pergolizzi JV, Bergese SD 2014. The effect of transdermal scopolamine for the prevention of postoperative nausea and vomiting. *Front Pharmacol.* 5: 55.

- Apfel CC, Zhang K, George E, Shi S, Jalota L, Hornuss C, Fero KE, et al. 2010. Transdermal scopolamine for the prevention of postoperative nausea and vomiting: a systematic review and meta-analysis. *Clin Ther.* 32: 1987-2002.
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol.* 68(3):209-245. doi:10.1016/s0301-0082(02)00079-5
- Bajo R, Pusil S, López ME, Canuet L, Pereda E, Osipova D, Maeustú F, Pekkonen E 2015. Scopolamine effects on functional brain connectivity: a pharmacological model of Alzheimer's disease. *Scientific reports.* 5(1): 1-6.
- Chan TY, Tang CH, Critchley JA 1995. Poisoning due to an over-the-counter hypnotic, Sleep-Qik (hyoscyne, cyproheptadine, valerian). *Postgrad Med J.* 71: 227-8.
- Chen C, Li XH, Zhang S, Tu Y, Wang YM, Sun HT 2014. 7, 8-dihydroxyflavone ameliorates scopolamine-induced Alzheimer-like pathologic dysfunction. *Rejuvenation Res.* 17(3): 249-254.
- El-Marasy SA, Abd-Elsalam RM, Ahmed-Farid OA 2018. Ameliorative effect of silymarin on scopolamine-induced dementia in rats. *Open Access Maced J Med Sci.* 6(7): 1215.
- Jeong EJ, Lee KY, Kim SH, Sung SH, Kim YC 2008. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* in scopolamine-treated mice. *Eur. J. Pharmacol.* 588(1): 78-84.
- Khosravi-Farsani N, Mashhadi Akbar Boobar M, Amini-Farsani Z, Heydari S, Teimori H 2016. Antioxidant and antiglycation effects of scopolamine in rat liver cells. *Der Pharmacia Lettre.* 8(1): 169-174.
- Klinkenberg I, Blokland A 2010. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 34(8):1307-1350. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.04.001
- Kranke P, Morin AM, Roewer N, Wulf H, Eberhart LH 2002. The efficacy and safety of transdermal scopolamine for the prevention of postoperative nausea and vomiting: a quantitative systematic review. *Anesth Analg.* 95: 133-43.
- LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. 2010. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 7. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548835/#_ncbi_dlg_citbx_NBK548835
- Luetje CM, Wooten J 1996. Clinical manifestations of transdermal scopolamine addiction. *Ear Nose Throat.* 75(4): 210-214.
- Nafady AM, Ahmed OB, Ghafeer HH 2017. Scanning and transmission electron microscopy of the cells forming the hepatic sinusoidal wall of rat in acetaminophen- and *Escherichia coli* endotoxin-induced hepatotoxicity. *Journal of microscopy and ultrastructure.* 5(1): 21-27.
- Palle S, Neerati P 2017. Quercetin nanoparticles attenuates scopolamine induced spatial memory deficits and pathological damages in rats. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University.* 55(1): 101-106.
- Renner UD, Oertel R, Kirch W 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. *Therapeutic drug monitoring.* 27(5): 655-665.

- Sabullah MK, Shukor MY, Sulaiman MR, Shamaan NA, Syed MA, Khalid A, Ahmad SA 2014. The effect of copper on the ultrastructure of *Puntius javanicus* hepatocyte. *AJBAS*. 8(15): 245-51.
- Sanchez CK, Lusk KA 2015. The Pharmacologic Management of Motion Sickness. *US Pharmacist*, 40(12): 34-38.
- Sandlin D 2002. Transderm scopolamine: A painless, noninvasive option for control of postoperative nausea and vomiting. *J Perianesth Nurs*.17(6): 427-429.
- Wei Y, Ying M, Xu S, Wang F, Zou A, Cao S, Jiang X, Wang Y 2016. Microdialysis pharmacokinetic study of scopolamine in plasma, olfactory bulb and vestibule after intranasal administration. *Drug Deliv*. 23(1), 263-268.
- Wisse E, Braet F, Duimel H, Vreuls C, Koek G, Damink SWO, Broek MAJ, Geest BD, Dejong CHC, Tateno C, Frederik P 2010. Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. *WJG*. 16(23): 2851.
- Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbe E, Vermoesen AN 1996. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol. Pathol*. 24(1): 100-111.
- Yeh S, Song XJ, Farley W, Li DQ, Stern ME, Pflugfelder SC 2003. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 44(1): 124-129.
- Zaki HF, Abd-El-Fattah MA, Attia AS 2014. Naringenin protects against scopolamine-induced dementia in rats. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ*.52(1): 15-25.



Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

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



Fitozom formülasyonundan berberin miktar tayini için HPLC yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonu

Ayça Güngör-Ak¹ , Ayşegül Karataş^{2*} 

¹Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

*Corresponding author : akaratas@pharmacy.ankara.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-5157-5187>

Received : 09/05/2020
Accepted : 06/12/2020

Özet: Bitkilerden elde edilen aktif bileşenlerin önemli bir bölümü, uzun yan zincirlere ve yüksek polariteye sahiptir. Bu da gastrointestinal mukozadan veya deriden pasif difüzyonla emilime engel teşkil etmektedir. Bu noktada, 'fito-fosfolipid' veya 'fitozom' olarak adlandırılan yeni kompleksleştirme tekniği, absorpsiyonu kolaylaştırmak ve biyoyararlanımı artırmakta önemli bir rol oynamaktadır. Fitozomlar, bitkisel kaynaklı etkin maddelerin soya lesitini gibi doğal fosfolipidlerle uygun bir solvan/solvan sisteminde kompleks oluşturması sonucu oluşan yapılardır. Fitozom formülasyonlarının karakterizasyonlarının yapılması amacıyla partikül boyutu ölçümü, etken madde salım hızı tayini, erime noktası tayini gibi in vitro testler yapılır. Enkapsülasyon etkinliği de ölçümü yapılarak değerlendirilen bir diğer parametredir. Enkapsülasyon etkinliği formülasyon içinde tutulan etken maddenin %'de olarak ifadesidir. Formülasyonun enkapsülasyon etkinliğinin tayin edilebilmesi için etken maddenin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonunun yapılması gerekir. Çalışmada fitozom formülasyonlarındaki berberin miktarını tayin etmek amacıyla HPLC metodunun geliştirilmesi ve analitik validasyonunun yapılması amaçlanmıştır. HPLC analizleri Agilent 1260 Infinity II cihazında Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 µm) kolonda, 1 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Berberin fitozom formülasyonundan berberinin miktar tayininin yapılması amacıyla HPLC miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve ilgili ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir. Berberinin fitozom formülasyonlarında bulunan yardımcı maddelerden ayrılarak miktar tayinin yapılabilmesi önemlidir. Bu noktada analitik validasyon parametrelerinden özgünlük detaylı olarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntem özgünlük, doğrusalık ve aralığı, doğruluk, kesinlik, geri elde edilebilirlik parametreleri yönünden değerlendirilmiş ve berberinin miktar tayini için güvenilir olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Berberin, Fitozom, Fosfolipid kompleks, HPLC, Analitik validasyon

Development and Validation of HPLC Method for the Quantification of Berberine in Phytosome Formulations

Abstract: An important part of the active ingredients derived from plants has long side chains and high polarity. This prevents absorption through passive diffusion from the gastrointestinal mucosa or skin. At this point, the new complexing technique called "phyto-phospholipid" or "phytosome" plays an important role in facilitating absorption and increasing bioavailability. Phytosomes are structures formed as a result of the fact that active ingredients of plant origin form complexes with natural phospholipids such as soy lecithin in a suitable solvent / solvent system. In order to make the characterization of phytosome formulations, in vitro tests such as particle size measurement, active substance release rate determination, melting point determination are performed. Encapsulation efficiency is another parameter that is evaluated by measuring. Encapsulation efficiency is the expression of the active substance in the formulation in %. In order to determine the encapsulation efficiency of the formulation, the quantification method of the active ingredient should be developed and analytical validation should be done. In this study, it was aimed to develop HPLC method and analytical validation to determine the amount of berberine in phytosome formulations. HPLC analyzes were carried out in the Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 µm) column on Agilent 1260 Infinity II device at a flow rate of 1 mL / min. In order to determine the berberine from the phytosome formulation, the HPLC quantification method was developed and validated according to the relevant ICH guidelines. It is important to be able to determine the amount of berberine by separating the excipients in the phytosome formulations. Therefore, specificity from analytical validation parameters has been evaluated in detail. The developed method was evaluated in terms of specificity, linearity and range, accuracy and precision parameters. It has been determined that the developed method is reliable for quantification of berberine in phytosome formulations.

Keywords: Berberine, Phytosome, Phospholipid complex, HPLC, Analytical validation

1. Giriş

Bitkilerden elde edilen aktif bileşenler eski zamanlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kidd 2009). Bitkisel kaynaklı etken maddelerin modern tedaviye aktarılması giderek yaygınlaşmaktadır. Fakat bu etken maddelerin önemli bir bölümü, uzun yan zincirlere ve yüksek polariteye sahiptir. Bu da gastrointestinal mukozadan veya deriden pasif difüzyonla emilime engel teşkil etmektedir (Karataş ve Turhan 2015). Bu noktada, 'fito-fosfolipid' veya "fitozom" olarak adlandırılan yeni kompleksleştirme tekniği, absorpsiyonu kolaylaştırmak ve biyoyararlanımı artırmakta önemli bir rol oynamaktadır. Fitozomlar, bitkisel kaynaklı etken maddelerin soya lesitini gibi doğal fosfolipidlerle uygun bir solvan/solvan sisteminde kompleksleştirilmesiyle oluşan yapılardır. Herbozom olarak da adlandırılabilirler. Temel olarak bitkisel aktif bileşen ve fosfolipid arasındaki etkileşim sonucu, su ve yağda çözünebilir bir kompleks meydana gelmektedir. Fitozomlar bitkisel etkin maddelerin akut ve kronik tedavide etkinliği belirleyen farmakokinetik ve farmakolojik parametrelerini iyileştirmek için uygun taşıyıcı sistemler olarak önerilmektedir. Berberin (BER); Berberin vulgaris, Berberis aquifolium, Hydrastis canadensis ve Coptis chinensis gibi birçok farklı bitkiden elde edilebilen kuaterner benzilzokinolin alkaloiddir. Çin tıbbında özellikle oral olarak diyare tedavisinde ve uzun zaman boyunca da antimikrobiyal olarak kullanılmıştır. Son yıllarda antihipertansif (Sut ve ark. 2017), hipoglisemik (Liang ve ark. 2019), antikanser (Wang ve ark. 2020), antidepresan (Kulkami ve Dhir 2010), antiinflamatuvar (Cicero ve ark. 2016) ve hepatoprotektif (Zhao ve ark. 2018) etkileri de çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Ancak berberinin oral biyoyararlanımı düşüktür. Berberinin zayıf oral biyoyararlanım göstermesinin sebepleri; karaciğerde ve bağırsakta ilk geçiş etkisine uğraması, kendi kendine birleşme göstermesi sonucu gastrointestinal alanda çözünürlüğünün azalması, barsak membranından geçişinin kısıtlı olması ve barsaktan geçişini sınırlandıran p-glikoprotein substratı olmasıdır. Bundan dolayı berberinin tedaviye aktarılabilmesi için ilaç taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi gerekliliği doğmuştur (Yu ve ark. 2017). Bitkisel aktif maddeler için ilaç taşıyıcı sistem olarak tercih edilen fitozom formülasyonunun berberin için kullanılması uygun görülmüştür. Fitozom formülasyonlarının karakterizasyonlarının yapılması amacıyla partikül boyutu ölçümü, etken madde salım hızı tayini, erime noktası tayini gibi in vitro testler yapılır. Enkapsülasyon etkinliği de ölçümü yapılarak değerlendirilen bir diğer parametredir. Enkapsülasyon etkinliği formülasyon içinde tutulan etken maddenin %'de olarak ifadesidir. Fito-aktif bileşen ve fosfolipidin yapısal bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla kullanılır. Fitozom yapısında tutulamayan serbest aktif bileşenin uygun bir yöntemle ölçülmesi sonucu da elde edilebilir. Santrifüj ile süpernatant ayrılarak formülasyon içine yüklenmeyen etken maddenin ölçümü yapılır. Bu ölçüm spektrofotometrik (UV-Vis) olarak ya da kromatografik (HPLC gibi) olarak tayin edilebilir (Ghanbarzadeh ve ark.

2016). Bu çalışmada fitozom formülasyonu içindeki berberin miktarını HPLC cihazıyla tayin etmek amacıyla analitik yöntemin geliştirilmesi ve validasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Berberin hidroklorür (BER), Soya Fosfatidilkolin, Asetonitril, Amonyum asetat, Metanol Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar da analitik kalitededir.

2.2. Kromatografik Sistem ve Koşullar

HPLC analizleri Agilent 1260 Infinity II cihazında Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 µm) kolonda, 1 mL/dk akış hızında, mobil faz olarak 67:33 (h/h) oranında 30 mM amonyum asetat:asetonitril karışımında 30 °C'de yapılmıştır. Örnekler 10 µL olarak sisteme enjekte edilmiştir. Dalga boyu analizler boyunca 346 nm olarak ayarlanmıştır.

2.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Berberinin stok çözeltisi 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanarak standart çözeltilerin konsantrasyonları 1 – 20 µg/mL olacak şekilde distile su ile seyreltilerek ayarlanmıştır.

2.4. Analitik Yöntemin Validasyonu

Optimize edilen analitik yöntem, ICH Q2 (R1) (ICH 2005) kılavuzuna göre doğruluk ve aralığı, doğruluk ve geri elde edilebilirlik, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), teşhis sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve özgünlük parametreleriyle doğrulanmıştır ve valide edilmiştir.

2.4.1. Doğrusallık ve Aralığı

Yöntemin belirli bir aralıktaki etken madde konsantrasyonu ile orantılı sonuçları verebilme yeteneğidir (Raposo ve Ibello-Bianco 2020). Doğrusallık verilen bir aralıktaki örnekte bulunan analitin bilinen konsantrasyonda ve enstrümental cevap arasındaki ilişkiyi belirtmek için lineer regresyon analizi kullanılarak belirlenir. Korelasyon katsayısı (r) ve determinasyon katsayısı (r²) doğrusallığı veren parametrelerdir. Doğrunun eğimi, analit konsantrasyonu ile test sonuçları arasındaki matematiksel ilişkiyi ifade eder. Analitik bir yöntemin aralığı ise kullanılan yöntemle göre etken maddenin yer aldığı alt ve üst limitler arasındaki oranın kesinlik, doğruluk ve doğrusallık açısından tayin edildiği aralıktır. Yöntemin doğrusallığı, doğrusal regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Buradan regresyon denklemi ve determinasyon katsayısı (R²) değeri elde edilmiştir. Analitik yöntemin doğrusallığının analizi için, etken maddenin farklı stok çözeltileri hazırlanmıştır ve bu stok çözeltilerden hareketle 1-20 µg/mL konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bilinen konsantrasyonlara (x) karşı elde edilen alanlar (y) grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

2.4.2. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Doğruluk ve geri elde edilebilirlik değeri elde edilen değerin, gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Aynı zamanda analitik yöntemin hatasızlığının bir ölçüsüdür. Analitik işlemin doğruluğu en az üç farklı konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numunedeki miktarların belirlenen konsantrasyonlardaki % geri elde değerlerinin ortalaması, bu dağılımın standart sapması ve % bağıl standart sapması hesaplanarak tayin edilmektedir. Yöntemin doğruluğunun tayini için bu şekilde belirlenen % bağıl standart sapma değerinin % 2'den küçük olması gerekir. Doğruluğu tayin etmek amacıyla etken maddenin miktar tayininde kullanılmak üzere hazırlanan kalibrasyonlarda düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olarak belirlenen 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 16 µg/ml konsantrasyonlarda BER çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir çözelti HPLC'de arka arkaya 6 kez analiz edilmiştir. Okunan alan değerleri kalibrasyon doğru denkleminde yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmış buradan hareketle % geri elde ve % bağıl standart sapma (% BSS) değerleri bulunmuştur.

2.4.3. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği aynı homojen numunenin belirlenen şartlar altında çok sayıda analizlerinden elde edilen ölçüm sonuçlarının yakınlığı olarak ifade edilir. Kesinlik belirlenen işlem koşullarında yöntemin, tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak üç farklı seviyede incelenmektedir. Analitik yöntemin kesinliği ölçümlerin standart sapma ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri bulunarak test edilmiştir. Kesinliği tayin etmek amacıyla etken maddenin miktar tayininde kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve ara kesinliği değerlendirilmiştir.

2.4.3.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik aynı koşullar altında ve kısa bir zaman aralığında yöntemin kesinliğini göstermektedir. BER'in miktar tayininde kullanılmak üzere yapılan kalibrasyonlarda tekrarlanabilirlik tayini amacıyla düşük, orta ve yüksek konsantrasyon olarak belirlenen 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 16 µg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri (n=3) hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir çözelti arka arkaya 6 kez HPLC'de analiz edilmiştir. Elde edilen alan değerleri kalibrasyon doğrusunda yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmış, ortalama ve standart sapma değerleri elde edilmiş ve buradan % BSS değerleri bulunmuştur.

2.4.3.2. Ara kesinlik

Ara kesinlik farklı günler, farklı analistler ve farklı cihazlar gibi laboratuvar içi varyasyonların kesinliğini ifade eder. BER stok çözeltisinden hareketle hazırlanan 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 16 µg/ml konsantrasyonda numuneler (n=3) farklı günlerde HPLC'de 6 kez okutulmuştur. Elde edilen alan değerleri kalibrasyon doğrusunda yerine konularak konsantrasyon değerleri hesaplanmış, ortalama ve standart

sapma değerleri elde edilmiş ve buradan % BSS değerleri bulunmuştur.

2.4.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

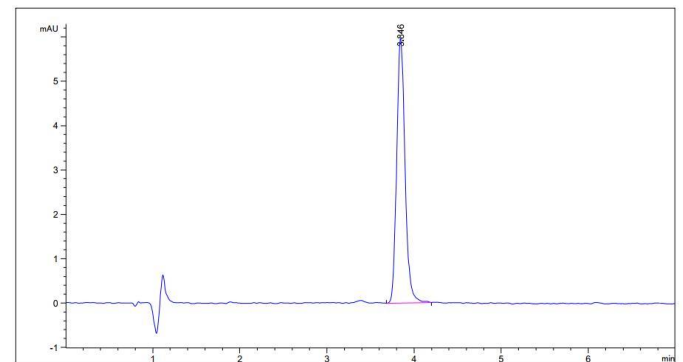
Bir analitik işlemin teşhis sınırı (Limit of Detection-LOD) analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği ama miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt konsantrasyondur (ICH 2005). Bir kaç yolla bulunabilir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi doğrudan gözlemlenerek de bulunabilir. Tayin sınırı (Limit of Quantification-LOQ) ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğruluk aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan konsantrasyon düzeyidir (ICH 2005). Teşhis sınırı regresyon denklemlerinin kesim noktalarının standart sapmasının doğrunun eğimine bölünerek 3.3 ile çarpılması ile hesaplanmıştır; aynı değer 10 ile çarpılarak da tayin sınırı hesaplanmıştır.

2.4.5. Özgünlük

Özgünlük analiz esnasında numunede olması beklenen bileşikler varlığında da analiti kesin bir şekilde tayin edebilme özelliğidir (Raposo ve Ibelli-Bianco 2020). İn vitro deneylerde BER miktar tayini yapılırken fitozom formülasyonuna katılan yardımcı maddelerin BER'in HPLC analizinde elde edilen piki ile girişim yapıp yapmadığını gözlemek için etken madde, yardımcı madde ve etken madde – yardımcı madde karışımlarının ayrı ayrı çözeltileri hazırlanarak belirlenen koşullarda pikleri elde edilmiştir.

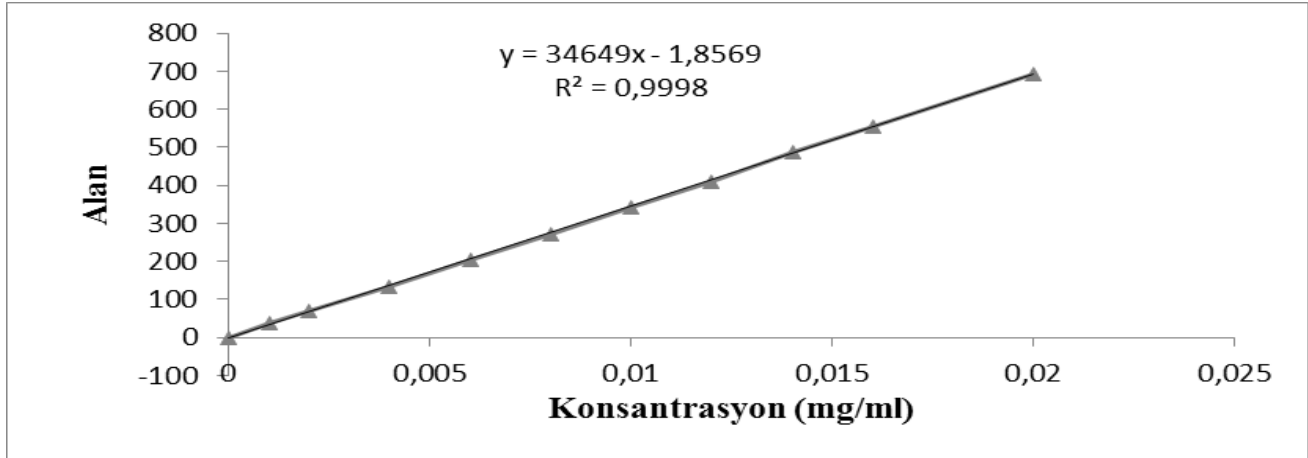
3. Bulgular ve Tartışma

Şekil 1'de gösterildiği gibi BER'in piki 3.846 dakikada elde edilmiştir.



Şekil 1. BER'in pikini gösteren HPLC kromatogramı

Kalibrasyon eğrisinin regresyon denklemi $y=34649x-1,8569$ (Şekil 2) olarak bulunmuştur. Determinasyon katsayısı 0,9998 olarak elde edilmiştir.



Şekil 2. BER'in miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde edilen regresyon doğrusu

Doğruluk ve kesinlik sonuçları sırasıyla standart sapma ve bağıl standart sapma açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen standart sapma ($< \pm 2\%$) ve % bağıl standart sapma ($< 2\%$) değerleri, geliştirilen miktar tayini metodunun uygun olduğunu ve kesinliğini göstermiştir. Berberinin miktar tayini yönteminin analitik validasyonundan elde

edilen doğruluk ve geri elde edilebilirlik sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Teşhis ve tayin sınırı değerleri sırasıyla 0,3045 $\mu\text{g/ml}$ ve 0,9227 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Enjeksiyonun tekrarlanabilirliği sonuçları ise Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Berberinin distile su ortamında yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen doğruluk ve geri elde sonuçları

1. Konsantrasyon			2. Konsantrasyon			3. Konsantrasyon		
2 $\mu\text{g/ml}$			10 $\mu\text{g/ml}$			16 $\mu\text{g/ml}$		
Alan	C ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri elde	Alan	C ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri elde	Alan	C ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri elde
69,32	2,054	102,7	341,2	9,900	99,00	552,9	16,01	100,1
69,15	2,049	102,5	340,2	9,872	98,72	553,9	16,04	100,3
69,15	2,049	102,5	341,9	9,922	99,22	552,2	15,99	99,9
68,87	2,041	102,1	342,3	9,934	99,34	552,4	15,99	99,9
69,22	2,051	102,5	342,2	9,929	99,29	554,7	16,06	100,4
68,39	2,027	101,4	343,2	9,959	99,59	553,2	16,02	100,1
Ortalama		102,3	Ortalama		99,19	Ortalama		100,1
SS*		0,494	SS*		0,300	SS*		0,176
%BSS**		0,483	%BSS**		0,303	%BSS**		0,175

*SS Standart sapma, **BSS Bağıl standart sapma

Tablo 2. Berberinin distile su ortamında yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen tekrarlanabilirlik sonuçları

Teorik C ($\mu\text{g/ml}$)	Bulunan C ($\mu\text{g/ml}$) ($X \pm SS^{**}$)	% BSS***
2	2,02 \pm 0,021	1,039
10	9,91 \pm 0,047	0,474
16	16,03 \pm 0,041	0,256

*X= Ortalama, **SS Standart sapma, ***BSS Bağıl standart sapma

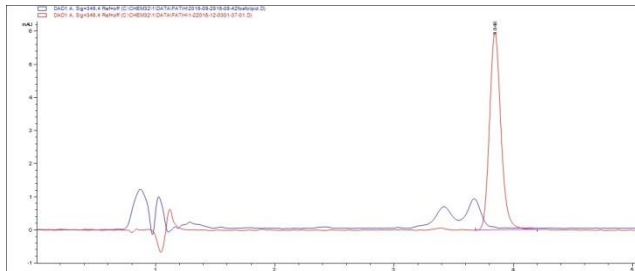
Tablo 3. Berberinin distile su ortamında yapılan miktar tayininin analitik validasyonundan elde edilen ara kesinlik sonuçları

Konsantrasyon (µg/mL)	1. gün (X* ± SS)	2. gün (X ± SS)	3. gün (X ± SS)	SS**	% BSS***
2	2,045 ± 0,009	2,017 ± 0,021	2,020 ± 0,017	0,015	0,761
10	10,01 ± 0,015	10,00 ± 0,013	10,01 ± 0,014	0,005	0,045
16	16,01 ± 0,008	16,01 ± 0,011	16,00 ± 0,012	0,001	0,002

*X= Ortalama, **SS Standart sapma, ***BSS Bağıl standart sapma

Analitik validasyon parametrelerinden kesinlik için değerlendirilen ara kesinlik sonuçları Tablo 3'de verilmiştir.

Özgünlük parametresini değerlendirmek adına yapılan çalışmalarda fitozom formülasyonunda yardımcı madde olarak kullanılan fosfolipidin, berberinin temiz ve keskin bir pik verdiği 346 nm'de berberine yakın yerde bir piki görülmüştür. Piklerin bir girişim yapıp yapmadığının anlaşılması için kromatogramlar üst üste çakıştırılmış ve ufak bir girişim yaptıkları görülmüştür (Şekil 3).



Şekil 3. BER ve fosfolipide ait kromatogramların üstüste çakıştırılması ile elde edilen kromatogram

Bu girişimin anlamlı olup olmadığını değerlendirmek adına R (ayırıcılık) değeri hesaplanmıştır. Kromatografide iki pikin nicel anlamda birbirinden ayrıldığını kabul etmek için R=1 olması gerekir. Ve bu ayırıcılık değeri iki bandın birbiri ile %2 oranında örtüştüğü anlamına gelirken, R=1.5 olması durumunda bu örtüşme % 1'e düşer ve iki pik birbirinden tamamen ayrılmış olur (Yılmaz ve ark. 1997). R (ayırıcılık) değeri Denklem 1'de verilen formül ile hesaplanmaktadır:

$$R = 2 \left[\frac{tr, A - tr, B}{Tw, A + Tw, B} \right] \quad (\text{Denklem 1.})$$

tr,A=A maddesinin alıkonma zamanı

tr,B=B maddesinin alıkonma zamanı

Tw,A=A maddesinin oluşan pik aralığının genişliği

Tw,B=B maddesinin oluşan pik aralığının genişliği

A maddesi BER için kromatogramından elde edilen veriler; tr,A 3.846 ve Tw,A 0.1017 ve B maddesi fosfolipid için kromatogramından elde edilen veriler; tr,B 3.672 ve Tw,B 0.1131 dir. Denklem 2'de yer alan formüle göre hesaplanan R değeri değerlendirilmiştir;

$$R = 2 \left[\frac{3.846 - 3.672}{0.1017 + 0.1131} \right] \quad (\text{Denklem 2.})$$

Maddelerin alıkonma zamanları ve pik aralıklarının genişliklerinden yararlanılarak hesaplanan R (ayırıcılık) değeri 1.616 çıkmıştır. Bu değer bize piklerin birbirinden tamamen ayrılmış olduğunu göstermektedir. Fitozom formülasyonunda berberin ve kullanılan fosfolipid arasında herhangi bir girişim bulunmamaktadır.

4. Sonuç

Berberin fitozom formülasyonundan berberinin miktar tayininin yapılması amacıyla HPLC miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve ilgili ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem özgünlük, doğruluk ve aralığı, doğruluk, kesinlik, geri elde edilebilirlik parametreleri yönünden değerlendirilmiş ve berberinin miktar tayini için güvenilir olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda berberinin formülasyon içinden tayin edilmesinde analitik validasyon parametrelerinden özgünlük parametresinin ön plana çıktığı görülmüştür. Saf berberinin miktar tayini yöntemi ve fitozom formülasyonundan berberinin tayini için geliştirilen yöntem karşılaştırıldığında bu yöntem için formülasyondaki diğer maddelerin de işin içine girmesiyle berberinin kesin bir şekilde tayin edilmesi önemli hale gelmiştir. Bu noktada çalışmamızda geliştirdiğimiz yöntemde ayırıcılık değeri de hesaplanmış ve güvenilir olarak maddemizin miktarının tayin edilebildiği görülmüştür.

Teşekkür Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 215S664).

Yazar Katkıları

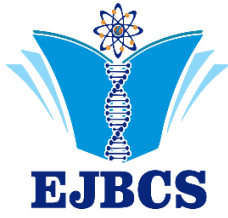
Fikir/Kavram: Ayşegül Karataş, Ayça Güngör Ak;
Tasarım: Ayşegül Karataş, Ayça Güngör Ak;
Denetleme/Danışmanlık: Ayşegül Karataş; Analiz ve/veya Yorum: Ayşegül Karataş, Ayça Güngör Ak; Kaynak Taraması: Ayşegül Karataş, Ayça Güngör Ak; Makalenin Yazımı: Ayça Güngör Ak; Eleştirel İnceleme: Ayşegül Karataş.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Kaynaklar

- Cicero AFG, Baggioni A 2016. Berberine and its role in chronic disease. In: Gupta S, Prasad S, Aggarwal B. (eds) Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases vol 928:27-45. Springer, Cham
- Ghanbarzadeh B, Babazadeh A, Hamishehkar H 2016. Nano-phytosome as a potential food-grade delivery system. *Food Biosci.* 15:126-135.
- International Conference on Harmonisation (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005. ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf. Accessed 10 May 2020.
- Karataş A, Turhan F 2015. Phyto-phospholipid complexes as drug delivery system for herbal extracts/molecules. *Turk J Pharm Sci* 12(1): 93-102.
- Kidd PM 2009. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev* 14(3): 226-46.
- Kulkarni SK, Dhir A 2010. Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res* 24(3): 317-324.
- Liang Y, Xu X, Yin M, Zhang Y, Huang L, Chen R, Ni J 2019. Effects of berberine on blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic literature review and a meta-analysis. *Endocr J.* 66(1):51-63.
- Raposo F, Ibelli-Bianco C. 2020. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends Anal. Chem.* 115913. doi: 10.1016/j.trac.2020.115913.
- Sut S, Faggian M, Baldan V, Poloniato G, Castagliuolo I, Grabnar I, Peron G 2017. Natural deep eutectic solvents (NADES) to enhance berberine absorption: an in vivo pharmacokinetic study. *Molecules.* 22(11): 1921.
- Wang ZC, Wang J, Chen H, Tang J, Bian AW, Liu, T, Yang F 2020. Synthesis and anticancer activity of novel 9, 13-disubstituted berberine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 30(2): 126821.
- Yılmaz A, Genç Ö, Bektaş S 1997 *Enstrümantal Analiz Yöntemleri (ikinci baskı)*, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- Yu F, Ao M, Zheng X, Li N, Xia J, Li Y, Chen XD 2017. PEG-lipid-PLGA hybrid nanoparticles loaded with berberine-phospholipid complex to facilitate the oral delivery efficiency. *Drug Deliv.* 24(1): 825-833.
- Zhao Z, Wei Q, Hua W, Liu Y, Liu X, Zhu Y 2018. Hepatoprotective effects of berberine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Biomed Pharmacother.* 103: 1319-1326.



The availability of irrigation and fogging systems in crop production under greenhouse conditions by evaluating rain water

Murat Özocak^{1*} 

¹Namik Kemal University, Tekirdağ Agricultural Faculty, Biosystem Engineering PhD. Candidate, Tekirdağ, Turkey

*Corresponding author : murat.ozocak@outlook.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-3997-9290>

Received : 01/05/2020
Accepted : 19/11/2020

Abstract: Providing sustainable crop production regardless of climate conditions can be realized with production in greenhouse conditions. Greenhouse irrigation and moisture balance are among the systems related to the environmental conditions required for plant development. All the water resources are decreasing day by day due to the indiscriminate practices in agricultural irrigation and the pollution caused by the leakage of waste materials directly into the water resources. For this reason, water saving methods should be used in irrigation and fogging systems to be made in greenhouse conditions. With the method of harvesting rainwater, which is used in today's conditions, a special water collection system is planned in the roof system during the greenhouse design phase, and the accumulated water is transferred to the water collection pool with the help of pipes. The water accumulated in the water collection pool is transferred to the greenhouse irrigation and fogging systems by using pressurized systems when needed. In this study, it is aimed to give information in the context of the literature on the collection and accumulation of rainwater, which is being used recently in modern greenhouses, and the establishment of irrigation - fogging systems. For this purpose, it has been revealed that the information obtained by literature review is compiled and water saving can be achieved in greenhouse cultivation. In the compilation study, it is recommended to support the studies on the technology of harvesting rainwater in greenhouse and to encourage the investments to be made in this field.

Keywords: Greenhouse, Irrigation systems, Fogging systems, Rain waters, Water harvesting, Water storage

Yağmur suyunun değerlendirilmesi ile sera koşullarında tarımsal üretimde sulama ve sisleme sistemlerinin sağlanabilirliği

Özet: İklim koşullarına bağlı olmaksızın sürdürülebilir bitkisel üretimin sağlanması, sera koşullarında üretim ile gerçekleştirilebilmektedir. Sera içi sulama işleminin yapılması ve nem dengesinin sağlanması, bitki gelişimi açısından gerekli çevre koşulları ile ilgili sistemlerin başında gelmektedir. Tarımsal sulamada gelişmiş şekilde hoyratça yapılan uygulamalar ve atık maddelerin doğrudan su kaynaklarına sızması sonucu oluşan kirlilik nedeniyle, tüm su kaynakları her geçen gün daha da azalmaktadır. Bu nedenle, sera koşullarında yapılacak olan sulama ve sisleme sistemlerinde, su tasarrufu sağlayan yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Günümüz koşullarında kullanılmaya başlanan yağmur sularının hasadı yöntemiyle, sera tasarlama aşamasında çatı sisteminde özel su toplama sistemi planlanmakta olup, biriktirilen su borular yardımıyla su toplama havuzuna aktarılmaktadır. Su toplama havuzunda biriktirilen su, ihtiyaç duyulduğunda basınçlı sistemlerden yararlanılarak sera içi sulama ve sisleme sistemlerine aktarılmaktadır. Bu çalışmada, günümüzde modern seralarda yeni kullanılmaya başlanan yağmur sularının toplanması ve biriktirilmesi ile sulama - sisleme sistemlerinin oluşturulması ile ilgili literatür kapsamında bilgi verilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, literatür taraması ile elde edilen bilgiler derlenerek seracılıkta su tasarrufunun sağlanabileceği ortaya konulmuştur. Yapılan derleme çalışmasında seracılıkta yağmur sularının hasadı teknolojisi ile ilgili çalışmaların desteklenmesi ve bu alanda yapılacak yatırımların teşvik edilmesinin gerekliliği tavsiye edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sera, Sulama sistemleri, Sisleme sistemleri, Yağmur suları, Su hasadı, Su depolama

1. Introduction

Greenhouse, cultivation started at the beginning of the 19th century in Northern European countries, and II. It has developed in the world after the World War. Starting greenhouse operations in the province of Antalya Turkey in the 1940s, is today in the Mediterranean and Aegean regions heavily (Kervankıran, 2011; Çerçioğlu ve Şahin, 2016).

Creating a suitable climate for the growth and development of plants in greenhouses, It is achieved by controlling variables such as temperature, relative humidity, solar radiation. In classical type greenhouses, the climate, sun outside the greenhouse, temperature, humidity, rain. It changes constantly. This change occurs according to the energy-mass balance in the greenhouse. Other one in a sense, some of the energy coming on the greenhouse is stored, some of it is given outside. If the leaf temperature is high, it is caused by the excess energy stored in the plant. Excess energy accumulation, by activation of ventilation or cooling systems. It is tried to be resolved to a certain extent (Wee 2010).

Irrigation is generally defined as the water required for plant development but cannot be met naturally, to the soil without causing environmental problems. In order to maintain the aesthetic beauty of the landscape areas, most of these areas apply irrigation similar to natural precipitation to keep them alive. If this is not done, most of the parks and green areas around us can be lost. With the effective and continuous use of our water resources, it is hoped that the maintenance and irrigation of these systems and the expansion of the landscape areas (Smith 1997).

Between 1950 and 1990, while the world population doubled, the amount of water used increased 6 times. It is estimated that the annual water amount of 7300 m³ per capita in 1995 will decrease to 4800 m³ in 2025. A rapid decline is observed due to annual renewable fresh water per capita, rapid population growth in the country, urbanization and industrialization events and increased water consumption on a personal basis. According to these developments, while the amount of water per capita in our country was 1950 m³ in 1990, this figure will decrease to 1500 m³ in 2000, and it is estimated that our population will be around 100 million in 2030, and that water consumption per capita will be around 1000 m³ / year (Anonymous 1998). Thus the left and sufficient water resources for the future generations to Turkey should be used very well preserved.

In our country, it is aimed to obtain more products in greenhouse than the unit area. For this reason, the number of plants grown in the unit area and the biomass weights obtained are high. Depending on the product variety and climate characteristics of our agricultural areas, large amounts of organic waste are generated and generally there is no systematic evaluation of these wastes. Sonmez et al. (2002) in a study conducted in Antalya-Kumluca, it is stated that approximately 57 500 tons of plant waste annually from tomato greenhouses, and 330 625 tons of plant waste in

Antalya province are discarded randomly and destroyed by burning.



Figure 1. Modern greenhouse with air conditioning control

The aim of this study is to meet the water source needed in the greenhouses from the climate conditions in irrigation and fogging systems, which is one of the most important production ways in order to increase the agricultural products in the face of the population increase in the the world. In this way, the nutritional needs of the growing population will be met on the one hand, and water supply will be provided to be used in agricultural production without damaging the decreasing water resources with each passing day.

2. Material and Method

One of the variables required to provide optimum conditions for crop production in the greenhouse is the provision of irrigation and fogging systems. For the greenhouse, irrigation systems should be provided to provide fogging for the moisture balance and the water needed by plant products. The study material was composed of national and international studies on irrigation and fogging systems in greenhouses and the availability of rainwater harvesting of these systems. In the light of the information collected from these studies, the path to be followed in the research has been determined.

3. Results

Within the scope of the research, the findings related to the automated irrigation and fogging systems to be provided in the greenhouse and rainwater harvesting methods are tried to be explained under the following sub-titles.

3.1. Fogging Systems

Fogging System is the system used to cool the environment in a short time and to provide the moisture needed by the plant in the greenhouse. One of the systems installed in the greenhouses to provide the moisture that the plant needs and to reduce the greenhouse indoor temperature is the fogging method.

Fogging method is one of the systems established to provide the moisture required by the plant in the greenhouses and to decrease the indoor temperature of the greenhouse. In the fogging system, heat is absorbed from the ambient air by the evaporation of water sprayed with high pressure, and the absorbed heat is transported outside the greenhouse by air. The fogging heads are placed at the top of the greenhouse at 1m intervals and at a height of about 1m from the plant height. Fogging is applied by running the heads every 5 minutes for 5 or 10 seconds. The fogging system is preferred in places with low humidity and high temperature because the system increases the humidity together with cooling (Sarikoç 2007).

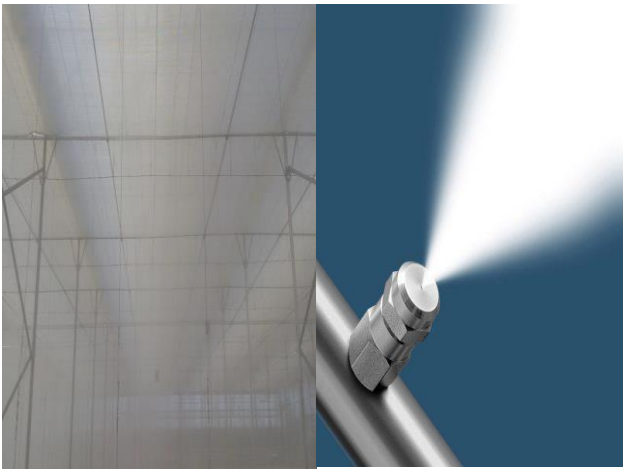


Fig.2. Greenhouse fogging systems

3.2.Irrigation Systems

Irrigation of water, which is necessary for plant development but cannot be provided by precipitation, through artificial means is called irrigation, and the way this water is given to the soil in the plant root zone is called irrigation method. Pressurized irrigation methods that can be used in greenhouse conditions; sprinkler irrigation method, drip irrigation method, bubbler irrigation method and micro sprinkler irrigation methods (Sarikoç 2007).

3.2.1. Sprinkler Irrigation Method

In this method, irrigation water is transported in closed pipes under pressure to mechanical sprayers and applied to the soil in a manner similar to natural precipitation. Almost all plants can be watered with this method if the paddy is kept separate. In sprinkling method, starting capital and operating costs are higher than surface irrigation methods. In this method, water application can be as low as 0.25 cm / hour. Thus, it can be applied without causing water loss and erosion in over inclined, uneven areas and soils with low depth, and it can be applied efficiently in soils with high permeability or low water holding capacity (Ertuğrul and Apan 1979).



Fig.3. Greenhouse sprinkler systems

Sprinkler irrigation method; It is one of the most suitable irrigation methods that can be used for irrigation of plants with low usable water holding capacity, high water intake rate, lightly structured soils, especially high economic value and sensitive to moisture deficiency in the soil (Demirel 2005).

3.2.2.Drip Irrigation Method

With drip irrigation, evaporation from the dry soil surface, surface runoff and deep leakage are prevented, water saving is increased and irrigation efficiency increases. Since the irrigation water requirement is also less for the unit area, a larger area can be irrigated with the water source at hand. Thus, it is possible to use the water optimally where the water supply is limited (Kanber et al. 1994).

Fertilizer saving is also provided since the necessary fertilizer for plants can be given to the plant root area with irrigation water in the desired time and amount. Weed development decreases as water will not reach between the rows in which drip irrigation is applied in row plantings. Herbicides to be given by irrigation water are effective against weeds that can develop in wet areas (Haroğlu 2000). The structure of the drip irrigation system to be used in greenhouses is shown below (Anonim 2019).

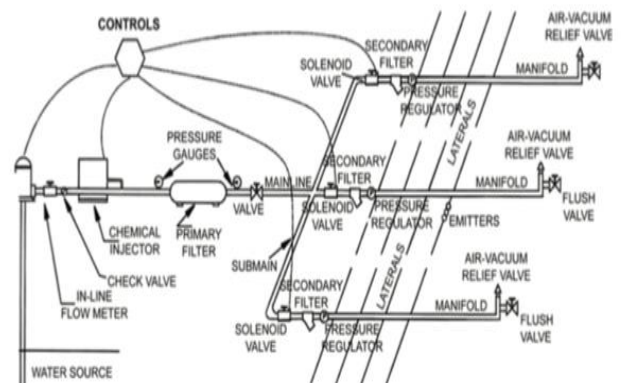


Fig.4. Structure of drip irrigation system

3.2.3. Micro Sprinkler Irrigation Method

This sprinkler irrigation method using small sprinkler heads is called "Micro sprinkler irrigation method". System elements are the same as drip irrigation system elements. The only difference is that small sprinkler heads are used instead of drippers. In other words, this method is a form of irrigation where drip irrigation system and small sprinkler heads are used, but irrigation is done by sprinkler irrigation method. In this method, a lateral pipeline is laid during each tree and a sprinkler head is placed under each tree along the lateral (Güngör et al. 1995).

3.2.4. Bubbler Irrigation Method

Bubbler irrigation method is mostly suitable for irrigation of trees, shrubs and orchards and not for grass and other field crops. The basis of the system consists of the lateral pipe that conducts water with low pressure and transparent polyethylene water distribution pipes with a diameter of 10-12 mm (Sarikoç 2007).



Fig.5. Bubbler irrigation method

4. Discussion

In cooling with fogging method, in the greenhouse from a sufficient height from the plants placed on pipes passed along made with spray nozzles. It the primary purpose of the method; greenhouse air Although it is moisturizing, the plants for cooling and even irrigation functions is used (Öztürk ve Başçetinçelik, 2002).

Low and low in the cooling system by fogging. There are two methods, high pressure. The low pressure of these is 300-400 kPa pressure between 50-100 μm and medium produces bulky drop diameters. High pressure in systems, it works between 3.5-7.0 MPa pressure and they produce drop diameters of 2-60 μm . High pressure systems low pressure finer droplets than systems they produce faster evaporation and cooling rate increases (Li ve Willits, 2008).

Rain water can be collected and treated and reused. Instead of rainwater, it can be evaluated in different ways depending on the amount and type of use. Examples include barrels used for storing rainwater, rain gardens, wet and dry ponds. It is possible to collect and store water flowing from roofs

in large facilities, to be used as water for ice skating rinks, garden irrigation and industry, and to be used as reservoir water in toilets. In addition, storing rainwater helps to reduce the risk of floods and floods by reducing the amount of water mixed into the network during periods of heavy rainfall (Silkin, 2014).

The idea of rainwater collection actually appears as a method used since ancient times. The cisterns used to prevent water shortage in drought periods were used to collect rainwater. Today, rainwater is obtained by using cistern systems, especially in arid regions where agriculture is common (Şahin & Manioğlu, 2011).



Fig.6. Water storage cistern

Advanced rainwater collection system; collection surface consists of horizontal and vertical grooves, filters, pump, rainwater tank and distributor systems. According to the need of use in buildings, the quality of water is divided into two as drinking and utility water (water not of drinking water quality). Although the water collected from the roofs is used as some utility water, it can be purified and brought to the level of drinking water (Şahin and Manioğlu 2011).

The use of rainwater on a global scale is increasing day by day. Rain water is stored in many cities of Japan, especially in Tokyo. Rain waters are collected in the region of the Fiji Islands and used when needed. From a numerical perspective, there are rainwater use systems in approximately 25,000 homes in the USA (Alparslan et al., 2008).

Rain water is collected from roofs or from the surface using two different techniques and drinking water, irrigation and cleaning etc. It can be used for purposes. The collected water is also leaked underground for purposes such as preventing ground collapse and feeding groundwater resources. Today, collecting and using rainwater has become one of the alternative water sources due to reasons such as the consumption of fresh water resources and pollution (Alparslan et al., 2008).



Fig.7 Rainfall Collection System

5. Conclusion

Globally, natural water resources are decreasing day by day. Meeting the growing population's water needs with available resources will be in danger in the near future. In this regard, measures to save money should be taken in all areas of water use. In agricultural production, where water consumption is the most intense, all developments in this regard should be followed closely.

The main purpose of irrigation is to provide the water lost through transpiration and evaporation from the soil for healthy agricultural production. In this regard, the most important condition that should be provided in agricultural production under greenhouse conditions is to meet the plant water consumption.

In greenhouse conditions, the water requirement of the plants should be met with minimum water consumption. Likewise, in-greenhouse humidification is of great importance in terms of agricultural production. Planning the irrigation and fogging systems that should be provided in greenhouse conditions in the most economical way is a great necessity in terms of decreasing water resources every day.

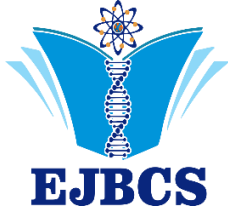
Within the scope of national and international researches, the study was conducted on storing rainwater in modern greenhouses and using irrigation and fogging systems for the greenhouse. As a result of the study, it was concluded that it is possible to transfer the water collected by the rainwater harvesting system to be designed in the roof system of the greenhouses to the water tank to be projected underground. In this way, the water required in agricultural production for the greenhouse can be obtained naturally. Vegetable production will be done without damaging the existing water resources, and the desired amount of product can be provided at any time, regardless of climate conditions.

Conflict of interest disclosure:

There is no conflict of interest.

References

- Alpaslan N, Tanık A, Dölgen D. 2008. "Türkiye'de Su Yönetimi Sorunlar ve Öneriler", TÜSİAD Yayın No:T/2008-09/469, 2008. s:27-39.
- Anonim 1998. DSİ (Devlet Su İşleri), DSİ Dünya Su Günü Basın Bildirisi, Trabzon.
- Anonim 2019. Drip Irrigation Checklist: Winterization. <https://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=C1094&title=Drip%20Irrigation%20Checklist:%20Winterization>. Accessed 18 October 2019
- Çerçioğlu, M. ve Sahin, H. 2016. Simav'daki seraların ısıtılmasında jeotermal enerji kullanım olanakları. *The Journal of Academic Social Science Studies, International Journal of Social Science*, 47: 459-475.
- Demirel K. 2005. Peyzaj Projelerinde Kullanılan Farklı Yağmurlama Sulama Başlıklarının Performanslarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Ertuğrul H, Apan H. 1979. Sulama Sistemlerinin Projelendirilmesi. Erzurum Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 562. Erzurum
- Güngör Y, Erözel AZ, Yıldırım O. 1995. Sulama. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1443. Ankara
- Haroğlu R. 2000. Peyzaj Uygulamalarında Sulama Sisteminin Seçimi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Kanber R, Köksal H, Önder S, Eylen M. 1994. Farklı Sulama Yöntemlerinin Genç Portakal Ağaçlarında Verim, Su Tüketimi ve Kök Gelişimine Etkisi. *Journal of Agriculture and Forestry*, 20:163-172.
- Kervankıran, I., 2011. Afyonkarahisar ilinde alternatif tarım çalışmalarına bir örnek: Jeotermal seracılık. *Marmara Coğrafya Dergisi*, 24: 382-402.
- Li, S., Willits, D.H., 2008. Comparing low-pressure and high-pressure fogging systems in naturally ventilated greenhouses. *Biosystems Engineering*, 101(1): 69- 77.
- Öztürk, H.H., Başçetinçelik, A., 2002. Seralarda Havalandırma. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 227, Adana
- Sarıkoç E. 2007. Peyzaj Alanlarında Kullanılan Sulama Yöntemleri ve Bitki Su Tüketim Modellerinin Türkiye'nin Üç Farklı İklim Bölgesinde Uygulanması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon
- Smith WS. 1997. *Landscape Irrigation Design and Management*. New York John Wiley & Sons, Inc, pp 229-230.
- Silkin H. 2014. İklim Değişikliğine Uyum Özelinde Bazı Uygulamaların Türkiye 74 Açısından Değerlendirilmesi. Orman ve Su İşleri Uzmanlık Tezi. Orman ve Su İşleri Bakanlığı. Su Yönetimi Genel Müdürlüğü, Ankara
- Şahin Nİ, Manioğlu G. 2011. Binalarda Yağmur Suyunun Kullanılması, X. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, s. 527
- Wee Fong Lee, 2010, Cooling Capacity Assessment Of Semi Closed Greenhouses. Graduate Program in Food, Agricultural and Biological Engineering The OhioState University, p.114 Ohio.



Kedilerde Piretroid Toksikasyonu

Rahmi Canbar^{ID}, Enver Yazar^{ID}*

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

*Corresponding author : enveryazar@hotmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-6508-7245>

Received : 06/08/2020
Accepted : 06/12/2020

Özet: *Chrysanthemum cinerariaefolium* bitkisinin çiçeklerinin böceklerle karşı etkinliğinin belirlenmesinden sonra sentetik türevleri sentezlenmiştir. Sentetik türevlere piretroidler adı verilmiştir. Günümüzde sentetik piretroidler insektisit ve ektoparaziter (kene, bit, pire, uyuz) amaçla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Türkiye’de permetrin, deltametrin, flumetrin, sipermetrin, fenvalerat ve sifulitrin içeren ticari ürünler köpek, at, sığır, koyun ve keçilerde kullanılmak üzere ruhsatlandırılmıştır. Permetrin içeren ürünler köpeklerde oldukça fazla kullanılmaktadır. Memeli türleri genellikle piretroidlere duyarlı değildir. Ancak kediler oldukça duyarlıdır. Kedilere yanlışlıkla piretroid uygulanması ve/veya piretroid uygulanan köpeklerle kedilerin temasa geçmesi sonucunda kedilerde ciddi zehirlenmeler gelişebilmektedir. Bu derlemede kedilerde gözlenen piretroid zehirlenmeleri, klinik görünümü ve tedavileri hakkında bilgiler verilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Piretroid, kedi, zehirlenme

Pyrethroid Toxication in Cats

Abstract: Synthetic derivatives were synthesized after determining the effectiveness of the flowers of the *Chrysanthemum cinerariaefolium* plant against insects. These synthetic derivatives are called pyrethroids. Nowadays, synthetic pyrethroids are widely used as insecticide and ectoparasitic (tick, lice, fleas, scabies). Permethrin, deltamethrin, flumethrin, cypermethrin, fenvalerate and cyfluthrin containing commercial products has been licensed for use in dogs, horses, cattle, sheep and goats in Turkey. Products containing permethrin are widely used in dogs. Mammals are generally not susceptible to pyrethroid, but cats are quite sensitive. Serious poisoning may develops in cats as a result of accidental application of pyrethroids and/or contact of cats with pyrethroids treated dogs. In this review, it could be tried to give information about pyrethroid poisoning, clinical appearance and treatments in cats.

Keywords: Pyrethroid, cat, poisoning

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Piretrinler ilk olarak yaprak bitleri ve hamam böceklerine *Chrysanthemum cinerariaefolium* bitkisinin çiçeklerinin etki ettiğinin gözlenmesi ile kullanılmaya başlanmıştır. Sonrasında sentetik olarak üretilerek piretroidler adı verilmiştir. Piretroidler parazitlerin kitin yapısını pasif difüzyonla geçerek sodyum kanallarının kapanmasını engelleyip felce neden olarak etki gösterdikleri ifade edilmiştir. Ayrıca bazı türlerinin klor kanalları üzerinden de etki gösterebileceği belirtilmiştir. Sonuçta parazitlerin ölümüne neden olurlar. Bu bileşikler veteriner ve beşeri hekimlikte ektoparaziter ve insektisit olarak kullanılmaktadır (Balcioglu ve ark 2004, Anadon ve ark 2009, Das ve Aksoy 2016).

Türkiye’de piretroidlerden permetrin (köpek, at), deltametrin (köpek, koyun, sığır), flumetrin (köpek, koyun, sığır), sipermetrin (köpek, at, keçi, koyun, sığır), fenvalerat (sığır) ve sifulitrin (sığır) içeren tasma, damla, toz veya banyo tarzında satılan ticari preparatları bulunmaktadır. Ürünler insektisit olarak kullanılması yanında hedef türlerde ektoparaziter (bit, pire, uyuz, kene) amaçlı kullanılırlar (Yazar 2018, Yazar 2019).

Bu derlemenin devamında kedilerde gözlenen piretroid kaynaklı zehirlenme vakaları, klinik bulgular ve tedaviler hakkında bilgiler verilmeye çalışıldı.

2.Kedilerde Zehirlenmeler

Bazı ülkelerde piretroid kaynaklı zehirlenmelerin kedilerde en çok gözlenen zehirlenme tiplerinden biri olduğu ifade edilmiştir (Berny ve ark 2010, Caloni ve ark 2016, Bertero ve ark 2020). Kedilerde sentetik piretroidlerin, piretrinlerden daha zehirli olduğu (Berny ve ark 2010) ve Türkiye’de veteriner alanda kullanılan ürünlerin tamamının piretroid grubu olduğu ifade edilmiştir (Yazar 2018). Köpekler için kullanımı ruhsatlandırılmış piretroidlerin, kedilerde gözlenen ilk on zehirlenme nedenleri arasında olduğu bildirilmiştir (Merola ve Dunayer 2006). Özellikle altı haftadan küçük kedi yavrularında glukronidasyon eksikliği nedeni ile çok daha zehirli kabul edilirler (Woodward 2005). Ancak kedilerde gözlenen duyarlılığın sadece bu eksikle açıklanamayacağı da ifade edilmiştir (Anadon ve ark 2009).

Permetrinin kedilerdeki letal dermal dozu yaklaşık 100 mg/kg’dır ve kedilerde piretroid zehirlenmesine bağlı ölüm oranının yaklaşık %2.5-17 arasında olduğu bildirilmiştir (Bahevan ve Oguz 2019). Başka bir kaynakta ise permetrinin kedilerde zehirlenme nedenleri arasında ilk beşte bulunduğu ve ölüm oranının %10-40 arasında değiştiği ifade edilmiştir (Taylor 2016). Köpekler için damla ve banyo şeklinde satışa sunulan permetrin içeren ürünlere kedilerin kazara maruz kalması ile zehirlenmeler gözlenebilmektedir. Doğrudan temas dışında, bazı vakalarda permetrin spot-on ürünü uygulanan köpeklerle yakın temas (yakın uyuma veya tımar) sonrasında kedilerde permetrin zehirlenmesi gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bazı vakalarda ise köpekler için üretilen ticari ürünün bir damlasına maruz kalan kedilerde zehirlenmeler gözlenebildiği bildirilmiştir. Klinik belirtiler genellikle ilk birkaç saat içinde ortaya çıkmaktadır, ancak bazen bir veya üç gün arasında ortaya çıkabileceği de bildirilmiştir. Zehirlenmelerde tüm vücutta gözlenen titremeler en yaygın belirtidir. Ayrıca nöbet, kaslarda seğirmeler, aşırı duyarlılık, ateş, hipersalivasyon, göz bebeklerinde büyüme, geçici körlük, kusma, ishal ve solunum güçlüğü gözlenebildiği ifade edilmektedir (Merola ve Dunayer 2006, Anadon ve ark 2009, Taylor 2016, Bates 2020).

Permetrinle zehirlenen 286 adet kedinin genelinde konvülsiyonlar, seğirme, titreme, kas fasikülasyonları, aşırı duyarlılık, ateş ve salya artışı gözlemlendiği, iyileşmelerin ilk birkaç gün içinde geliştiği, ancak bazı vakalarda 7 güne kadar uzadığı bildirilmiştir. Kedilerde %10.5 oranında ölüm gözlemlendiği ifade edilmiştir (Sutton ve ark 2007).

Permetrinle zehirlenen 42 adet kedide klinik olarak titreme, kas fasikülasyonları, seğirmeler, aşırı duyarlılık, nöbetler, ateş, salya artışı, ataksi, midriyazis ve geçici körlük geliştiği bildirilmiştir. Tedavide dermal kontaminasyonda yıkama ile birlikte metokarbamol dışında antikonvulzanlar ile destek tedaviler uygulandığı belirtilmiştir. Bir kedinin ötenazi

edilmek zorunda kaldığı ifade edilmiştir (Boland ve Angles 2010).

Permetrinle zehirlenen 20 kedide en fazla gözlenen klinik belirtilerin titremeler, kas fasikülasyonları, hipertermi ve nöbetler olduğu bildirilmiştir. Tedavide deterjanla yıkama, diazepam (0.5 mg/kg, IV veya rektal devamında 0.1–0.5 mg/kg/saat), propofol (4–6 mg/kg IV bolus devamında 0.1–0.5 mg/kg/saat), metokarbamol (55–200 mg/kg, TOD, PO, <günlük doz 330 mg/kg), kristalloid (IV) ve göz lubrikantı uygulandığı ifade edilmiştir. Ayrıca klinik durum değişikliği gözlem altında tutulmuştur. Tedaviler yapılmasına rağmen bir vakanın öldüğü bildirilmiştir (Dymond ve Swift 2008).

Piretroid ile zehirlenen 18 kedide salya artışı, nöbet, midriyazis, titremeler, hipotermi ve aşırı duyarlılık gözlemlendiği, 16 adetine normal semptomatik tedavi uygulandığı, 2 adetine intravenöz lipid emülsiyonu uygulandığı ve genel iyileşme süresinin birkaç gün olduğu bildirilmiştir (Amfim ve ark 2016).

Permetrinle zehirlenen iki kedi yıkandıktan sonra diazepam, propofol, pentobarbital ve sıvı tedavisi yanında %20’lik intravenöz lipid emülsiyon (2 mL/kg bolus uygulama sonrasında 4 mL/kg/saat) uygulandığı ifade edilmiştir. Bir kedide bir doz daha uygulamaya ihtiyaç duyulduğu, kedilerde zehirlenmelerde uygulanabileceği bildirilmiştir (Bruckner ve Schwedes 2012).

Permetrinle zehirlenen ve titremeler gözlenen iki kediyeye sabunla yıkama sonrası, oksijen, fenobarbital, diazepam, %25 mannitol, metokarbamol, ringer laktat uygulamaları yapıldığı ve birkaç gün sonra hastaların iyileştiği bildirilmiştir (Draper ve ark 2013).

Permetrinle temas tarzında zehirlenen bir kedide titreme, nöbet ve salya artışı gözlemlendiği bildirilmiştir. Tedavide kedinin şampuanla yıkandığı, oral alım ihtimaline karşı aktif kömür (%20, 20 mL), parenteral dengeli sıvı tedavisi, metokarbamol ve %20’lik intravenöz lipid emülsiyonu uygulandığı ve ertesi gün %20’lik intravenöz lipid emülsiyonu uygulamasının tekrar yapıldığı ve yaklaşık iki gün sonra hastanın iyileştiği ifade edilmiştir (DeGroot 2014).

Dermal yolla 71 mg/kg fenvalerata maruz kalan üç kediden ikisinin öldüğü ve birinin komaya girdiği bildirilmiştir. Klinik olarak nöbet, kas titremeleri ve salya artışı gözlemlendiği belirlenmiştir (Anadon ve ark 2009). Fenvalerat ve N,N-diethyl-m-toluamide (Deet) kombinasyonu zehirlenmesi şüpheli iki kedide 4-6 saat sonrasında titreme, nöbet, salya artışı, ataksi ve depresyon gözlemlendiği ve ikisinin de öldüğü bildirilmiştir (Dorman ve ark 1990). Fenotrin ve etofenproks gibi piretroidlerde kedilerde zehirlenmelere neden olabilmektedir (Merola ve Dunayer 2006).

3. Tedavi Seçenekleri

Zehirlenmeye karşı özel antidot bulunmamaktadır. Salya artışı kontrol etmek için atropin kullanımı düşünülse de merkezi sinir sistemi uyarısı ve taşikardik etkiler gösterebileceği unutulmamalıdır. Piretroidler suda çözünmediği için kedilerin tüylerinden etkenin temizlenmesi amacı ile sıvı el bulaşık deterjanı veya şampuanla yıkanabileceği bildirilmektedir (Anadon ve ark 2009). Yıkamada sıcak suyun vazodilatasyon neden olabileceği ve buna bağlı olarak zehirin emiliminin artma ihtimaline karşı ılık su kullanılması gerektiği tavsiye edilmektedir. Hipotermi ise zehrin etkisini artırabilmektedir. Ayrıca komtamine kıl bölgesi tıraş edilmelidir (Taylor 2016). Vitamin E'nin deriye lokal uygulamasının piretroidlerin neden olduğu deri reaksiyonlarını azalttığı belirlenmiştir (Anadon ve ark 2009). Tedavide kas gevşetici ve sakinleştiriciler kullanılabilir. İlk uygulama olarak titremelere karşı kas gevşetici metokarbamol (44-200 mg/kg, yavaş IV) kullanılabilir. Bu dozda günde üç defa uygulanabilir, ancak günlük doz 330 mg/kg dozu aşmamalıdır. Damar içi preparatların temin edilemediği durumlarda, tabletler ezilerek gastrik sonda ile mideye veya rektal yolla aynı dozda uygulanabilir. Metokarbamolun yeterli olmadığı durumda barbitüratlar, propofol (0.05-0.3 mg/kg/dakika) veya her ikisi birden kullanılabilir (Richardson 2000, Merola ve Dunayer 2006, Taylor 2016). Diazepam (0.25 mg/kg, IV), midazolam (0.3 mg/kg, IV-IM veya 0.002-0.005 mg/kg/dakika) (Taylor 2016) veya deksmedetomidin (1 mcg/kg, IV veya 10 mcg/kg, IM) kullanılacak diğer ilaçlardır. Permetrinle zehirlenen kedilerde metokarbamol bulunmadığı durumlarda özellikle erken dönemde deksmedetomidin kullanılabilirliği ifade edilmiştir (Ceccherini ve ark 2015). Bazı vakalarda paradoksik olarak benzodiazepin uygulamasının nörolojik belirtileri artırdığı bildirilmiştir (Siroka ve Svobodova 2013). Nöbetler gözlenmeye başladığında fenobarbital (2-4 mg/kg, bolus IV) iki saat ara günlük maksimum 20 mg/kg dozda kullanılabilir (Taylor 2016). Standart tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda %20'lik intravenöz lipid emülsiyonunun (Bahcivan ve Oguz 2019) olabildiğince erken kullanılması tavsiye edilmektedir (Bates 2020). Uygulamanın iyileşmeyi hızlandırdığı ve ölüm oranını düşürebileceği bildirilmiştir (Haworth ve Smart 2012, Kuo ve Odunayo 2013, Peacock ve ark 2015). Ancak kedilerde belirlenmiş net dozaj rejimi bulunmamaktadır. Kedilerde %20'lik intravenöz lipid emülsiyonu içeren preparatlardan 1.5 mL/kg (IV bolus) uygulaması önerilir. Devamında ise 0.25 mL/kg/dakika dozunda 0.5-1 saat aralıklarla klinik semptomlar gözlemlendiğinde kullanılabilirliği bildirilmiştir. Farklı bir dozaj rejimi olarak 1.5 mL/kg (IV bolus) dozunda 4-6 saat aralıklarla 24 saat boyunca kullanılabilirliği ifade edilmiştir. Bir diğer alternatif dozaj rejimi olarak 2.25 mL/kg (bolus IV) dozunda uygulama sonrasında 6.5 saat süresince 0.025 mL/kg/dakika dozunda kullanılabilirliği bildirilmiştir (Taylor 2016). İntravenöz lipid emülsiyonu uygulaması sonrasında nadiren bazı vakalarda yan etki olarak korneal lipidosis gelişebileceği bildirilmiştir. Ancak bu yan etkinin tedaviye gerek kalmadan birkaç günde (3-7)

düzelebileceği ifade edilmiştir (Seitz ve Burkitt-Creedon 2016, Yuh ve Keir 2018). Miyoglobüri gelişme ihtimaline karşı sıvı tedavisi önerilmektedir (Merola ve Dunayer 2006). Hastalar sakin, sessiz ve uyanıklardan uzak bir ortamda tutulmalıdır. Her türlü stimulasyona dikkat edilmelidir. Gelişen aşırı salya alınmalı, gerekirse oksijen uygulaması ve entübasyon yapılmalıdır (Taylor 2016).

Piretroidler uçucu olmadığı için genellikle inhalasyonla zehirlenme gözlenmez. Kedilerde bir saatten erken oral alımlarda kusturucu olarak ksilazin (0.2 mg/kg, IV veya 0.5-1 mg/kg, IM) uygulanabilir. Ancak hayvanda ciddi depresyon gelişmişse veya yutma refleksi tamamen kaybolmuşsa uygulanmamalıdır. Oral alımdan sonraki ilk 3-4 saat içinde aktif kömürle (2 g/kg) birlikte diyaretikler (%10 magnezyum sülfat solüsyon, 0.5 g/kg, PO veya %70 sorbitol, 3 mL/kg) uygulanabilir (Anadon ve ark 2009). Benzer şekilde insanlarda oral maruziyetlerde oral aktif kömür, antihistaminik, vitamin E ve çirpınmalara karşı benzodiazepinler önerilmiştir (Ozkaya ve ark 2013).

4. Sonuç ve Öneriler

Kedilerde piretroid zehirlenmeleri güncelliğini korumaktadır ve sıklıkla kazara gelişmektedir. Zehirlenmelerde ise doğrudan bilinen bir antidotu bulunmamaktadır. Temasla gelişen zehirlenmelerde kılların tıraş edilmesi ve ılık deterjanlı veya şampuanlı su ile yıkama ilk yapılacak işlemdir. Çevresel uyanıklardan uzak tutulmalıdır. Gelişen titreme ve nöbetlere karşı kas gevşeticiler, antiepileptikler veya anestezipler (metokarbamol, propofol, diazepam, midazolam, deksmedetomidin, fenobarbital) kullanılabilir. Burada seçimi yapılacak ilaç veya ilaç kombinasyonları ve dozaj rejimleri vakanın durumuna göre veteriner hekimce yapılmalıdır. Son yıllarda ise %20'lik intravenöz lipid emülsiyonu içeren preparatların uygulamasının faydalı etkileri bildirilmiştir. Oral alımlarda ise genel destek tedavinin yanında aktif kömür ve laksatif uygulaması yapılabilir. Gelişen duruma göre oksijen ve ringer laktat uygulaması da düşünülmelidir. Yapılan destek tedavilere rağmen ölüm oranı yine de yüksek düzeylerde kalabilmektedir. Hayvan sahiplerinin bilgilendirilmesi zehirlenme oranını düşürebilir.

Kaynaklar

- Amfim A, Simion VE, Parvu M, 2016. Epidemiological and therapeutic approaches in cats pyrethroids poisoning. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara*, 49:11-16.
- Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Martinez MA, 2009. Use and abuse of pyrethrin and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *Vet J*, 182:7-20.
- Bahcivan E, Oguz H, 2019. Intravenous lipid emulsion treatment in poisoning. *Dicle Univ Vet Fak Derg*, 12(1):70-77.
- Balcioglu IC, Kurt O, Ozbilgin A, 2004. Antiparasitic drugs. *ANKEM Derg*, 18(4):237-244.
- Bates N, 2020. Poisons affecting the neurological system. *Vet Nurse*, 11:116-125.
- Berny P, Caloni F, Croubels S, Sachana M, Vandebroucke V, Davanzo F, Guitart R, 2010. Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. *Vet J*, 183:255-259.

- Bertero A, Fossati P, Caloni F, 2020. Indoor poisoning of companion animals by chemicals. *Sci Total Environ*, 733:139366.
- Boland LA, Angles JM, 2010. Feline permethrin toxicity: retrospective study of 42 cases. *J Feline Med Surg*, 12:61-71.
- Bruckner M, Schwedes CS, 2012. Successful treatment of permethrin toxicosis in two cats with an intravenous lipid administration. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, 2:129-134.
- Caloni F, Cortinovis C, Rivolta M, Davanzo F, 2016. Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *Sci Total Environ*, 539:331-336.
- Ceccherini G, Perondi F, Lippi I, Grazia G, Marchetti V, 2015. Intravenous lipid emulsion and dexmedetomidine for treatment of feline permethrin intoxication: A report from 4 cases. *Open Vet J*, 5(2):113-121.
- Das YK, Aksoy A, 2016. Pesticides. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2(2):1-17.
- DeGroot WD, 2014. Intravenous lipid emulsion for treating permethrin toxicosis in a cat. *Can Vet J*, 55:1253-1254.
- Dorman DC, Buck WB, Trammel HL, Jones RD, Beasley VR, 1990. Fenvalerate/N,N-diethyl-m-toluamide (Deet) toxicosis in two cats (abstract). *JAVMA*, 196(1):100-102.
- Draper WE, Bolfer L, Cottam E, McMichael M, Schubert T, 2013. Methocarbamol CRI for symptomatic treatment of pyrethroid intoxication: A report of three cases. *J Am Anim Hosp Assoc*, 49(5):325-328.
- Dymond NI, Swift IM, 2008. Permethrin toxicity in cats: A retrospective study of 20 cases. *Aust Vet J*, 86:219-222.
- Haworth MD, Smart L, 2012. Use of intravenous lipid therapy in three cases of feline permethrin toxicosis. *J Vet Emerg Crit Care*, 22(6):697-702.
- Kuo K, Odunayo A, 2013. Adjunctive therapy with intravenous lipid emulsion and methocarbamol for permethrin toxicity in 2 cats. *J Vet Emerg Crit Care*, 23(4):436-441.
- Merola V, Dunayer E, 2006. The 10 most common toxicosis in cats. *Vet Med*, 6:339-342.
- Ozkaya G, Celiker A, Kocer-Giray B, 2013. Evaluation of insecticide poisoning and the cases in Turkey. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 70(2):75-102.
- Peacock RE, Hosgood G, Swindells KL, Smart L, 2015. A randomized, controlled clinical trial of intravenous lipid emulsion as an adjunctive treatment for permethrin toxicosis in cats. *J Vet Emerg Crit Care*, 25(5):597-605.
- Richardson JA, 2000. Permethrin spot-on toxicoses in cats. *J Vet Emerg Crit Care*, 10:103-106.
- Seitz MA, Burkitt-Creedon JM, 2016. Persistent gross lipemia and suspected corneal lipidosis following intravenous lipid therapy in a cat with permethrin toxicosis. *J Vet Emerg Crit Care*, 26(6):804-808.
- Siroka Z, Svobodova Z, 2013. The toxicity and adverse effects of selected drugs in animals – overview. *Polish J Vet Sci*, 16:181-191.
- Sutton NM, Bates N, Campbell A, 2007. Clinical effects and outcome of feline permethrin spot-on poisonings reported to the Veterinary Poisons Information Service (VPIS), London. *J Feline Med Surg*, 9:335-339.
- Taylor S, 2016. Why are cats still dying from permethrin toxicity? *Vet Times*, August:1-7.
- Woodward KN, 2005. Veterinary pharmacovigilance. Part 2. Veterinary pharmacovigilance in practice – the operation of a spontaneous reporting scheme in a European Union country – the UK, and schemes in other countries. *J Vet Pharmacol Therap*, 28:149-170.
- Yazar E, 2018. Veterinner İlaç ve Aşı A'dan Z'ye. Nobel tıp kitapevi, İstanbul, Türkiye.
- Yazar E, 2019. Kemoterapötikler, in: Veteriner İlaç Rehberi ve Tedavi El Kitabı, Ed: Yazar E, Nobel tıp kitapevi, İstanbul, Türkiye.
- Yuh EL, Keir I, 2018. Hypertriglyceridemia and transient corneal lipidosis in a cat following intravenous lipid therapy for permethrin toxicosis. *Can Vet J*, 59:155-158.



EJBCS