



EJBCS

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

Cilt: 3 Volume: Suppl. 1 Year: 2020

e-ISSN 2651-5237



EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Cilt: 3 Volume: Suppl. 1 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: Suppl. 1 Year: 2020

Contents / İçindekiler

Research Articles / Araştırma Makeleleri

Phytoplankton composition of Hirfanlı Dam Lake (Kırşehir-Turkey) 169-174

Ozlem ABLAK GURBUZ

Removal of Methyl Red from Aqueous Solutions with Natural and Biochar Prina: A Full Factorial Modeling Study 175-179

Sevda Esma DARAMA, Semra ÇORUH, Yusuf TİBET

La³⁺, Ho³⁺ katkılı seryum oksidin sol-jel yöntem ile sentezi: kafes kusurları ve optik özellikleri üzerindeki değişim 180-188

Rabia KIRKGEÇİT, Handan ÖZLÜ TORUN

Distinctive features of species of Spicara genus in Sevastopol coastal area 189-194

Natalya KUZMİNOVA

Alüminyum oksit'in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarında Total Hemosit Sayıları Üzerine Etkileri 195-198

Pınar ÖZALP, Ayşe KARA, Benay TUNÇSOY

Anter Kültürü Tekniği ile Dihaploid Nitelikli Üç Burun ve Dolma Tipli Biber Hatlarının Geliştirilmesi 199-205

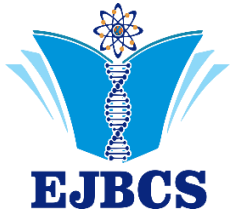
Atiye Püren CEYHAN, Hakan AKTAŞ

***Urtica dioica* Bitki Özütlerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi . 206-212**

Sevilay ÇOLAK, Nazan ÇÖMLEKCİOĞLU, Ashabil AYGAN

Çinko Oksit Nanopartikülünün *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae) (L.) Larvalarında Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi 213-216

Pınar ÖZALP, Benay TUNÇSOY, Yağmur MEŞE



Phytoplankton composition of Hirfanlı Dam Lake (Kırşehir-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 : 25/12/2020

Abstract: The phytoplankton of the Hirfanlı dam lake was investigated monthly between August 2008 and July 2009. The samples were taken using plankton net with a pore diameter of 55 µm. A total of 69 taxa belonging to 6 divisions have been identified, including Bacillariophyta (32 taxa), Chlorophyta (18 taxa), Cyanobacteria (11 taxa), Euglenophyta (2 taxa), Charophyta (4 taxa), Miozoa (2 taxa). Seasonal distribution of phytoplankton was also investigated. Seasonal increase rate was determined higher in spring, summer, and autumn. Even though seasonal distribution of phytoplankton species varied, *Navicula* sp., *Cyclotella* sp., *Nitzschia* sp., *Gomphonema* sp., and *Lyngbya* sp. were found as dominant.

Keywords: Phytoplankton, algae, Hirfanlı dam lake

Hirfanlı Baraj Gölü'nün fitoplankton kompozisyonu

Özet: Hirfanlı baraj gölü fitoplanktonu Ağustos 2008-Temmuz 2009 tarihleri arasında aylık olarak incelenmiştir. Örnekler 55 µm göz açıklığına sahip plankton ağı kullanılarak toplanmıştır. Bacillariophyta (32 takson), Chlorophyta (18 takson), Cyanobacteria (11 takson), Euglenophyta (2 takson), Charophyta (4 takson), Miozoa (2 takson) olmak üzere toplam 6 divizyoya dahil 69 takson teşhis edilmiştir. Fitoplanktonların mevsimsel dağılımı da incelenmiştir. Mevsimsel artış oranı ilkbahar, yaz ve sonbaharda daha yüksek olarak belirlenmiştir. Fitoplanktonların mevsimsel dağılımı değişmesine rağmen *Navicula* sp., *Cyclotella* sp., *Nitzschia* sp., *Gomphonema* sp., ve *Lyngbya* sp. dominant olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Fitoplankton, alg, Hirfanlı baraj gölü

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Hirfanlı dam is one of the dams located on the Kızılırmak River which originates from Karadağ Spring in central Anatolia and flows to the Black Sea (Fig. 1). The altitude and reservoir area of dam lake are 856 m and 320 km². The mean depth and volume of the dam lake are 83 m and 7.63 x 10⁹ m³, and a mid-Anatolian land-type climate prevails in the area. Hirfanlı dam built in 1959 for the purposes of energy production and flood control (DSI 1973).

Several studies on the phytoplankton and zooplankton in Hirfanlı dam lake have been undertaken (Baykal and Açıkgoz 2004; Yiğit and Altındağ 2005; Baykal et al. 2006). Algae are primary producers of the aquatic environment and their periodic investigations are extremely important for

aquatic life. Therefore, the aim of the present study was to examine phytoplankton compositions in the dam lake.

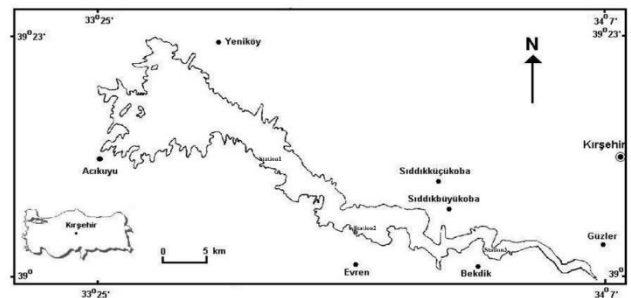


Fig. 1. Map of Hirfanlı dam lake

2. Materials and Method

Three stations were chosen in different areas of reservoir. The samples were taken from these stations each month between August 2008 and July 2009 vertically with 10 m intervals using plankton net with a pore diameter of 55 µm. Phytoplankton samples were placed in 250 ml dark bottles and fixed with 4% formaldehyde in the field. Identification of samples was performed on a light microscope. Diatoms were also analyzed using permanent preparations (APHA 1995). Phytoplankton species were identified according to (Round 1981; Round *et al.* 1990; Seckbach and Kociolek 2011; Kramer and Lange-Bertalot 1986, 1991a, 1991b; Huber–Pestalozzi, 1941, 1982; John *et al.* 2003; Komarek and Anagnostidis 2008; Bellinger and Sigeo 2015). Taxonomy of algae was controlled with <http://www.algaebase.org> (M.D. Guiry 1996–2020) website.

Nitrogenous and phosphate compounds of water were measured in the spectrophotometer with the colorimetric method, and standard methods have been applied for other parameters such as TH, PAL, MAL and PV analysis. SPC, TDS, SAL and TRB measurements were performed with YSI 6920 model Water Quality monitor, pH measurement was done with Sargent-Welch PBL model pH meter (Table 1).

3. Results

The pH of the dam lake shows slightly alkaline with its values between 7.8-8. Salinity rate varies between 0.63-0.71. While the conductivity in natural waters is between 20-180 µS/cm (Boyd 1988), it can be said that the conductivity in the dam lake is high (1255-1467 µS/cm). Dissolved oxygen values were within conventional values for reservoirs (7.8-10.3 mg/l) (Table 1). Some parameters for instance, temperature, dissolved oxygen concentration, nutrients and feeding pattern in the lake had important effects on the growth levels of phytoplankton (Baykal *et al.* 2006).

A total of 69 phytoplanktonic taxa was identified. Bacillariophyta comprised 46% (32 taxa) of the total taxa and were dominant in the phytoplankton. The remaining divisions were as follows: Chlorophyta 26% (18 taxa), Cyanobacteria 16% (11 taxa), Euglenophyta 3% (2 taxa), Charophyta 6% (4 taxa), Miozoa 3% (2 taxa). The list of phytoplankton is given in Table 2.

Species composition of this study is generally similar to Hirfanlı dam lake (Baykal and Açıkgöz 2004; Baykal *et al.* 2006), Altınapa dam lake (Yıldız 1986), Tercan dam lake (Altuner and Gürbüz 1996), Keban dam lake (Çetin and Şen 1997), Sarıyer dam lake (Atıcı 2002), Bafra Fish lakes (Gönülol and Çomak 1993), Asartepe dam lake (Atıcı and Obalı 2010), Mamasin dam lake (Atıcı and Alas 2012) and Çaygören reservoir (Sevindik 2010).

The highest number of species was recorded in spring (63 taxa) and summer (55 taxa) while the lowest species richness was found in winter (34 taxa). Bacillariophyta was the dominant phytoplankton group showing the greatest species richness (32 taxa) with large contribution of Naviculales (8 taxa). Species numbers of Bacillariophyta were high in spring (29 taxa) and summer and autumn (27 taxa). Naviculales were mostly consisted of *Navicula*, *Gyrosigma*, *Caloneis* and *Pinnularia* species. *Navicula* and *Nitzschia* were dominant genus and they were both represented with 7 taxa. Baykal and Açıkgöz (2004) also reported that *Nitzschia* and *Navicula* species are abundant and widespread in Hirfanlı Dam Lake. *Navicula*, *Nitzschia*, *Cyclotella*, *Gomphonema*, *Fragilaria* and *Cymbella* were widely found especially in spring and summer. *Cyclotella ocellata* is the dominant diatom in lakes in Turkey (Baykal *et al.* 2006). *Cyclotella* species are thought biyoindicators of transient phase from oligotrophic to eutrophic conditions (Round 1956) while *Nitzschia palea* shows widespread development in eutrophic environments (Round 1981). Diatom diversity is high and abundant in Turkish freshwaters (Atıcı and Obalı 2010).

The second dominant group was Chlorophyta (18 taxa) with large contribution of Sphaeropleales (9 taxa). Species numbers of Chlorophyta were high in spring (17 taxa) and summer (15 taxa). Sphaeropleales were mostly consisted of *Pediastrum*, *Scenedesmus* and *Ankistrodesmus* species. *Scenedesmus* and *Pediastrum* species were found in oligomesotrophic reservoirs in Turkey (İsbakan *et al.* 2002; Baykal and Açıkgöz 2004; Kıvrak and Gürbüz 2005).

Species richness of Cyanobacteria increased in summer with 11 taxa. With four species, Oscillatoriales has the most species. *Lyngbya*, *Microcystis*, *Oscillatoria* and *Anabaena* species were widespread in summer and spring months. According to Aysel (2005) *Anabaena* species were common in Turkey. Trifonova (1998) reported that Cyanobacteria species are significant planktons in summer and early autumn at eutrophic and mesotrophic lakes.

Charophyta was represented with 4 taxa of the order Desmidiatales and Zygnematales. Gönülol and Çomak (1993) reported that Zygnematales species are common in eutrophic and mesotrophic lakes rather than oligotrophic lakes in Turkey though they were accepted as characteristic species of oligotrophic lakes (Hutchinson 1967).

Euglenophyta and Miozoa were each represented by 2 taxa. *Euglena* increased especially in autumn. *Ceratium hirundinella*, were widespread taxa in summer, spring and autumn. It was reported that *Ceratium hirundinella* is a common species in Hirfanlı dam lake (Baykal and Açıkgöz 2004; Baykal *et al.* 2006), have a wide distribution in Turkey (Aysel 2005) and prefers mesotrophic lakes (Rawson 1956).

Table 1. Some physico-chemical parameters of water

Parameters		July		October		February		May	
		Surface	4m	Surface	6m	Surface	4m	Surface	4m
pH		8	7.8	7.8	7.8	8	8	7.9	7.8
SPC (Specific Electrical Conductivity)	µS/cm	1303	1311	1356	1381	1458	1467	1255	1404
TDS (Total Dissolved Solids)	mg/l	846	854	881	893	951	950	802	898
SAL(Salinity)	ppt	0,65	0,64	0,69	0,70	0,71	0,71	0,64	0,65
o-PO ₄ -P (Ortho Phosphate Phosphorus)	mg/l	0,01	0,01	0,03	0,03	0,025	0,015	-	-
NO ₂ -N	mg/l	0,014	0,013	0,007	0,006	0,002	0,002	-	-
NO ₃ -N	mg/l	0,14	0,12	0,46	0,22	0,23	0,41	-	-
NH ₃ -N	mg/l	0,41	0,79	0,12	0,13	0,88	0,85	-	-
PV (Permanganate Value)	mg/l O ₂	1,67	1,88	1,15	1,49	2,65	2,61	-	-
TRB (Turbidite)	NTU	0,4	5,2	0,7	0,5	-	-	-	-
DO (Dissolved Oxygen)	mg/l	8,4	7,8	9,1	8,7	10,3	10,1	9,5	9,2
T (Temperature)	°C	26,3	24,6	22	21,2	15,8	14,3	20	18,2
TH (Total Hardness)	mg/l (CaCO ₃)	380	382	399	400	442	443	381	387
PAL (Phenoltalein Alkalinity)	mg/l (CaCO ₃)	5	3	-	-	-	-	-	-
MAL (Total Alkalinity)	mg/l (CaCO ₃)	106	108	101	102	121	122	97	100

Table 2. Phytoplankton composition of Hirfanlı dam lake

	Summer	Autumn	Winter	Spring
Divisio: CYANOBACTERIA				
Ordo: Chroococcales				
<i>Chroococcus limneticus</i> Lemmermann	+	+		+
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing	+	+		+
Ordo: Synechococcales				
<i>Merismopedia elegans</i> A.Braun ex Kützing	+	+	+	+
<i>M. punctata</i> Meyen	+	+		+
Ordo: Oscillatoriales				
<i>Lyngbya</i> sp.	+	+	+	+
<i>Oscillatoria planktonica</i> Woll.	+	+	+	+
<i>O. tenuis</i> C. A. Agardh		+		+
<i>Phormidium</i> sp.				+
Ordo: Spirulinales				
<i>Spirulina jenneri</i> (Stizenberger ex Gomont) Geitler	+		+	+
Ordo: Nostocales				
<i>Anabaena</i> sp.	+	+		+
<i>Nostoc</i> sp.	+	+		+
Divisio: CHLOROPHYTA				
Ordo: Chaetophorales				
<i>Stigeoclonium</i> sp.	+	+	+	+
Ordo: Chlorellales				
<i>Oocystis borgei</i> J.W.Snow	+		+	+
<i>O. crassa</i> Wittrock in Wittrock & Nordstedt	+		+	+
<i>O. pusilla</i> Hansgirg	+	+		+
Ordo: Sphaeropleales				
<i>Pediastrum dublex</i> Meyen	+		+	+
<i>P. tetras</i> (Ehrenb.) Ralfs	+	+		+
<i>Scenedesmus acutiformis</i> Schroeder	+	+	+	+

<i>S. ecornis</i> (Ralfs) Chod.	+	+		+
<i>S. quadricauda</i> (Turp) Breb.	+	+	+	+
<i>Scenedesmus</i> sp.				+
<i>Ankistrodesmus longissimus</i> (Lemm.) Wille		+		+
<i>A. mirabilis</i> Korsch.	+	+		
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	+	+		+
<i>Tetraëdron minimum</i> (A. Braun) Hansgirg		+		+
Ordo: Chlamydomonadales				
<i>Chlamydomonas globosa</i> Snow	+			+
Ordo: Ulotrichales				
<i>Ulothrix variabilis</i> Kuetzing	+	+		+
Ordo: Cladophorales				
<i>Cladophora</i> sp.	+			+
Ordo: Oedogoniales				
<i>Oedogonium</i> sp.	+			+
Divisio: EUGLENOPHYTA				
Ordo: Euglenida				
<i>Euglena</i> sp.	+	+		+
<i>Phacus</i> sp.				+
Divisio: BACILLARIOPHYTA				
Ordo: Cocconeidales				
<i>Cocconeis pediculus</i> Ehrenberg	+	+	+	+
Ordo: Bacillariales				
<i>Nitzschia pusilla</i> Grunow	+	+	+	+
<i>N. fonticola</i> Grunow	+	+		
<i>N. fruticosa</i> Hustedt	+	+		+
<i>N. palea</i> (Kützing) W. Smith	+	+		+
Ordo: Cymbellales				
<i>Cymbella affinis</i> Kützing	+		+	+
<i>C. helvetica</i> Kützing	+	+	+	+
<i>C. microcephala</i> Grunow in Van Heurck	+	+		+
<i>C. prostrata</i> (Berkeley) Cleve		+	+	+
<i>Gomphonema</i> sp.	+	+		+
Ordo: Fragilariales				
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	+	+	+	+
<i>Diatoma</i> sp.	+			+
<i>Fragilaria virescens</i> Ralfs	+	+	+	+
<i>Synedra</i> sp.	+	+	+	+
Ordo: Naviculales				
<i>Gyrosigma acuminatum</i> (Kützing) Rabenhorst	+		+	+
<i>Navicula atomus</i> (Kützing) Grunow	+	+	+	+
<i>N. cuspidata</i> (Kützing) Kützing	+	+		+
<i>N. radiosa</i> Kützing	+	+	+	+
<i>Caloneis</i> sp.	+	+		+
<i>Pinnularia interrupta</i> W. Smith	+	+	+	+
<i>P. viridis</i> (Nitzsch) Ehrenberg		+		+
<i>Rhoicosphenia</i> sp.	+		+	+
Ordo: Surirellales				
<i>Cymatopleura</i> sp.		+	+	
<i>Surirella</i> sp.	+	+	+	+
Ordo: Thalassiophysales				
<i>Amphora ovalis</i> (Kützing) Kützing	+	+	+	+
Ordo: Stephanodiscales				
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	+	+	+	+
<i>Cyclotella ocellata</i> Pantocsek	+	+		+
Ordo: Melosirales				
<i>Melosira varians</i> Agardh.	+		+	+
Ordo: Mastogloiales				
<i>Achnanthes conspicua</i> A. Mayer		+	+	+
<i>A. oblongella</i> Oestrup	+	+	+	+
Ordo: Rhopalodiales				
<i>Epithemia</i> sp.	+	+	+	+
<i>Rhopalodia</i> sp.		+		
Divisio: CHAROPHYTA				
Ordo: Desmidiiales				
<i>Cosmarium</i> sp.		+	+	+
Ordo: Zygnematales				

<i>Zygnema</i> sp.		+		+
<i>Mougeotia</i> sp.		+	+	
<i>Spirogyra condensate</i> (Vaucher) Dumortier	+	+	+	+
Divisio: MIOZOA				
Ordo: Gonyaulacales				
<i>Ceratium hirundinella</i> (O.F. Muller) Dujardin	+	+		+
Ordo: Noctilucales				
<i>Noctiluca miliaris</i> Suriray, nom. inval.	+	+		

4. Conclusion

The increase in the concentration of nutrients leads to irregularities in the quality and quantity of phytoplankton (Baykal et al. 2006). Variation of water temperature may cause changes in the chemical and biological composition of the dam lake. It is quite difficult to identify the trophic status of lake using only some indicator types. Although Hirfanlı dam lake shows the mesotrophic character, it is under the threat of eutrophication (Baykal et al. 2006) due to farming activities using nitrogenous fertilizer, dewatering and temperature variations. In eutrophic lakes, summer phytoplankton population is high due to increasing water temperature. Similarly to that, phytoplankton population is found higher in spring and summer in this study. The trophic status of the lake should be examined periodically in terms of the efficiency of the aquatic ecosystem.

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

APHA (American Public Health Association) 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th Edn. Washington DC

Altuner Z, Gürbüz H 1996. Tercan Baraj Gölü Bentik Alg Florası Üzerinde Bir Araştırma, Turk J Bot 20: 41–51

Atıcı T 2002. Nineteen New Records from Sarıyar Dam Reservoir Phytoplankton for Turkish Freshwater Algae. Turk J Bot 26: 485-490

Atıcı T, Obalı O 2010. The diatoms of Asartepe Dam Lake (Ankara), with environmental and some physicochemical properties. Turk J Bot 34: 541-548

Atıcı T, Alas A 2012. A Study on the Trophic Status and Phytoplanktonic Algae of Mamasin Dam Lake (Aksaray-Turkey). Turk J Fish Aquat Sc 12: 595-601

Aysel V 2005. Checklist of the Freshwater Algae of Turkey. Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment 11(1): 1-124

Baykal T, Açıkgöz İ 2004. Hirfanlı Baraj Gölü Algleri. Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi 5(2): 115-136

Baykal T, Salman S, Açıkgöz İ 2006. The Relationship between seasonal variation in phytoplankton and zooplankton densities in Hirfanlı Dam Lake (Kırşehir, Turkey). Turk J Biol 30: 217-226

Bellinger EG, Sigeo DC 2015. Freshwater Algae. John Wiley & Sons, 275 pp.

Boyd CE 1988. Water Quality in Warmwater Fishponds. Auburn University, Agricultural Experiment Station

Çetin AK, Şen B 1998. Diatoms (Bacillariophyta) in the phytoplankton of Keban Reservoir and their seasonal variations, Turk J Bot 22: 25-33

DSI (General Directorate of State Hydraulic Works) 1973. Limnological report on Hirfanlı Dam Lake. Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü, Ankara, Turkey (in Turkish)

Gönülol A, Çomak Ö 1993. Bafra Balık Gölleri (Balık Gölü, Uzun Göl) Fitoplanktonu Üzerinde Floristik Araştırmalar III–Chlorophyta. Doga Turk J Bot 17: 227–236

Hutchinson GE 1967. A treatise on limnology. Introduction to lake biology and the limnoplankton. John Wiley and Sons, volume II, pp.115

John DM, Whitton BA, Brook AJ 2003. The Freshwater Algal Flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. The Natural History Museum and The British Phycological Society. Cambridge University Press, Cambridge.

Huber-Pestalozzi G 1941. Das Phytoplankton des Süßwassers. (Die Binnengewässer, Band XVI). Teil 2. (i) Chrysophyceen, Farblose Flagellaten Heterokonten. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

Huber-Pestalozzi G 1982. Das phytoplankton des süßwassers systematik und biologie, 8. Teil, 1. Halffe Conjugatophyceae Zygnematales und Desmidiales (excl. Zygnemataceae), E. Schweizerbarth'sche Verlagsbuchhandlung (Nagele u. Obermiller), Stuttgart.

İsbakan B, Gönülol A, Taş E 2002. A study on the seasonal variation of the phytoplankton of Lake Cernek (Samsun-Turkey). Turk J Fish Aquat Sc 2:121-128

Kıvrak E, Gürbüz H 2005. Seasonal variations in phytoplankton composition and physical-chemical features of Demirdöven Dam Reservoir, Erzurum, Turkey. Biologia, Bratislava, 60(1): 1-8

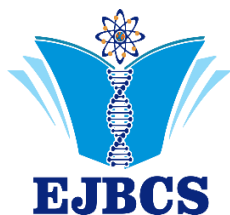
Komarek J, Anagnostidis K 2008. Cyanoprokaryota, 2. Teil/Part 2: Oscillatoriales, Süßwasser Flora von Mitteleuropa (Freshwater Flora of Central Europe).

Kramer K, Lange-Bertalot H 1986. Bacillariophyceae. 1. Naviculaceae. In: Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fischer Verlag, 2/1, Stuttgart, New York.

Kramer K, Lange-Bertalot H 1991a. Bacillariophyceae. 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunoticeae. In:Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fischer Verlag, 2/3, Stuttgart, New York.

Krammer K, Lange–Bertalot H 1991b. Süßwassers von Mitteleuropa, Bacillariophyceae Band 2/4, 4. Teil: Achnanthaceae, Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*

- Gesamtliteraturverzeichnis. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Rawson DS 1956. Algal Indicators of Trophic Lake Types. *Limnology and Oceanography* 4: 386-398
- Round, FE 1956. The phytoplankton of their water supply reservoir note Central Wales. *Arch F Hydrobiol* 220-232
- Round FE 1981. *The Ecology of Algae*. Cambridge University Press, London.
- Round FE, Crawford RM, Mann DG 1990. *The Diatoms: Morphology and biology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Seckbach J, Kociolek JP (eds) 2011. *The Diatom World*. Springer Science+Business Media BV, 521 pp.
- Sevindik TO 2010. Phytoplankton Composition of Çaygören Reservoir, Balıkesir-Turkey. *Turk J Fish Aquat Sc* 10: 295-304
- Trifonova IS 1998. Phytoplankton composition and biomass structure in relation to trophic gradient in some temperate and subarctic lakes of north-western Russia and the Prebaltic. *Hydrobiologia*, 370: 99-108
- Yıldız K 1986. Altınapa Baraj Gölü Alg Toplulukları Üzerinde Araştırmalar Kısım II: Sedimanlar Üzerinde Yaşayan Alg Topluluğu. *Doğa Bilim Dergisi*. 10(3): 547-554
- Yiğit S, Altındağ A 2005. A taxonomical study on the zooplankton fauna of Hirfanlı Dam Lake (Kırşehir), Turkey. *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi* 18(4): 563-567



Removal of Methyl Red from Aqueous Solutions with Natural and Biochar Prina: A Full Factorial Modeling Study

Sevda Esma Darama^{1*}, Semra Çoruh¹, Yusuf Tibet¹

¹Environmental Engineering Department, Engineering Faculty, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey.

*Corresponding author : sevda.akkaya@omu.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-6747-4679>

Received : 09/05/2020
Accepted : 25/12/2020

Abstract: Wastewater from various industries contains a high concentration of dyes. Dyeing wastewater is discharged into natural receiving waters without treatment; they are dangerous for both the environment and human health. Therefore, it is necessary to remove the dyes before it is discharged to the receiving environment. In this study, full factorial modeling of methyl red removal was studied by using an adsorption method, which is widely used in dye removal with natural and modified prina adsorbent. 2³ factorial design is used in the modeling method. In there 3 factors; adsorbent content (0.03g/30mL - 0.3g/30mL), initial dye concentration (30mg/L - 300mg/L) and adsorbent type (natural and biochar pomace) were selected. These factors were studied in two low (-1) and high (+1) levels. Effects of selected factors on adsorption efficiency; adsorbent type > initial concentration > adsorbent dosage. Besides, removal efficiencies up to 88% were obtained with biochar prina and it was found that prina is a good alternative adsorbent for methyl red removal.

Keywords: Adsorption, biochar, dye, full factorial, prina

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Dyes are widely used in various industries, such as textiles, paper, plastics, cosmetics, ceramics and leather, for coloring their final products. To remove dyes from aqueous solutions, many chemical or biological treatments have been used either individually or together. (Kose 2008). There are several dye removal methods, such as adsorption, oxidation-ozonation, coagulation, coagulation-flocculation and biological methods. Among these removal methods, adsorption is an attractive alternative method. Many adsorbents have been tested on the possibility to lower concentrations from aqueous solutions, such as active carbon, peat, olive oil waste (prina), chitin, red mud, calcite, clay, natural zeolites, bentonite, sepiolite, perlite, iron oxide coated sand, birnessite and others (Yin and Zhou 2015; Zhao and Chen 2012).

The olive processing industry disposes around four million tonnes of waste in olive stones (prina) each year. According to the International Olive Council, the world annual production of olive oil in 2012 was more than 3 million tons, translating to approximately 15 million tons of olive cakes as the by-products. Turkey is one of the Mediterranean

countries which are in the first range of olive and olive oil production. The annual production of olive oil in Turkey is 100.000–250.000 tons. This production amount creates 100.000–250.000 tons of solid wastes (Jaikumar et al. 2009; Luo et al. 2010).

These oil-producing wastes are commonly disposed of in the fields or burnt there with the loss of energy as well as causing different environmental problems such as fires, plagues CO₂ emissions to the atmosphere. Olive stone waste is a lignocellulosic material, with hemicellulose, cellulose and lignin as main components. Many current studies aim to develop methods of recovering the lignocellulosic material or biomass to produce solid, liquid, or gas biofuel. Therefore, widespread prina use is directed towards its use as a solid fuel or its derivatives fuel as a renewable energy (Luo et al. 2010). Other uses include activated carbon as biosorbent, animal feed, furfural production, plastic-filled, abrasive etc. In this study, we investigated the adsorption properties of prina by varying these factors at two levels. Interaction between these factors was studied and optimization was done.

2. Materials and Method

2.1. Materials

Prina was supplied by an olive oil producer from Ayvalık, Turkey. The wastes were rinsed three times with water then dried in an oven at 103°C until constant weight. They were ground and sieved for a particle size of 2.0–4.75mm. This material was named as natural prina. The carbonization step was carried out at 600 °C for 1 hour under purified nitrogen (99.99%). After carbonization, it was named biochar prina.

2.2. Method

In this study, a Full Factorial Design of Experiment was designed to investigate the effect of adsorbent amount, initial dye concentration and adsorbent type on removing methyl red ions with natural and biochar prina. The samples were mixed at predetermined periods at a temperature of 23°C in a shaker at 150 rpm until equilibrium was reached. The concentrations were measured with a Thermo brand Aquamate model UV spectrophotometer at 525nm wavelength. The removal efficiency (E) of natural and biochar prina on methyl red dye was calculated according to the following formula Equation 1;

$$E(\%) = [(C_0 - C) / C_0] \times 100 \quad (1)$$

Where; C_0 is the initial concentration of the dye solution (mg/L) and C is the dye solution's final concentration.

Full Factorial Design of Experiments examines every possible combination of factors at the levels tested (Lian et al. 2009; Iram et al. 2010). The general notation for a full factorial design run at b levels is $b^k = \#$ Runs, where k is the number of factors.

This study aims is to maximize the removal of methyl red dye ions (response variable). In this respect, experimental factors, which are adsorbent amount, initial dye concentration and adsorbent type, were selected as possible candidates affecting the removal percentage. By considering the earlier studies, two levels for each factor were determined. The 2^3 factorial design with high and low levels of factors are given in Table 1 (b=2 and k=3).

Table 1 The levels of experimental factors

Factor	Low Level (-1)	High Level (+1)
Adsorbent Amount (g/30mL) (A)	0.03	0.3
Methyl Red Dye Concentration (mg/L) (B)	30	300
Adsorbent Type (C)	Natural Prina	Biochar Prina

Interaction is a variation among the differences between means for different levels of one factor over different levels.

Using plus and minus signs to represent high and low levels of a factor, the main effects given in Table 2 were calculated by using the following general equation (Ai et al. 2006; Erbas and Semra 2006; Montgomery et al. 2001; Senoglu and Acitas 2014; Tibet and Coruh 2017).

Table 2 Experimental design matrix of methyl red dye removal efficiency

Run No	Factor			Efficiency (%)		Average
	A	B	C	Replicate		
				I	II	
1	-1	-1	-1	72.16	65.83	68.99
2	+1	-1	-1	71.51	65.70	68.60
3	-1	+1	-1	79.61	78.65	79.13
4	+1	+1	-1	88.71	85.21	86.96
5	-1	-1	+1	82.75	83.40	83.07
6	+1	-1	+1	83.66	83.14	83.40
7	-1	+1	+1	77.62	87.76	82.69
8	+1	+1	+1	89.91	86.08	87.99

3. Results

The residuals also appraised the sufficiency of the models. The observed residuals are plotted against the expected values, given by a normal distribution in Figure 1. Trends seen in Figure 1 reveal reasonably well-behaved residuals. In these graphics, the residuals seem to be randomly scattered.

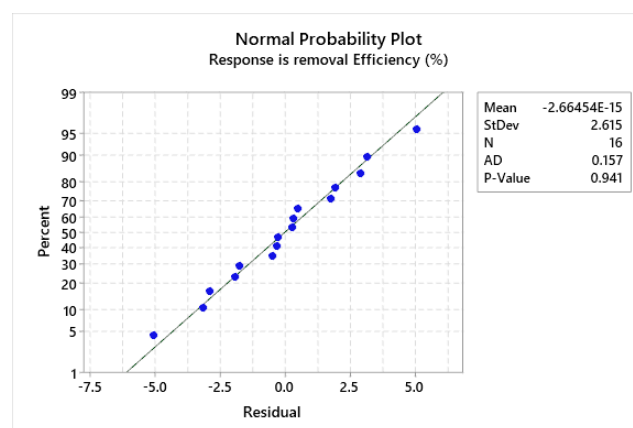


Fig. 1 Normal Probability plot

The Cube Plot in Figure 2 shows the predicted removal efficiency at combinations of the low and high experimental factors. In the study, the highest predicted value for the response variable is obtained at methyl red concentration at a high level, adsorbent amount at a high level and the adsorbent type at biochar prina.

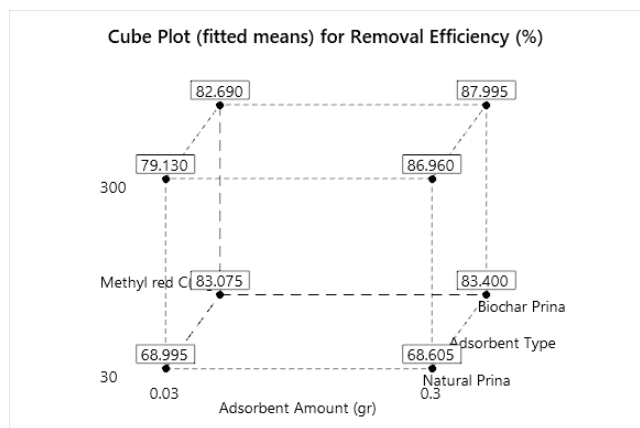


Fig. 2 Cube plot for methyl red removal efficiency

The R-square of the model (88.43%) was higher than the predicted value (78.32) % and fitted well the model's results. These results argued good agreements between the predicted and experimental values of methyl red removal efficiency (Table 3). In this way, the methyl red adsorption by natural prina and biochar prina could be expressed.

Table 3 Estimated Effects and Coefficients for removal efficiency

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-	80.106	0.895	89.48	0.000
Adsorbent Amount (g)	3.267	1.634	0.895	1.82	0.105
Methyl red C(mg/L)	8.175	4.088	0.895	4.57	0.002
Adsorbent Type	8.368	4.184	0.895	4.67	0.002
Adsorbent Amount (g)*Methyl red C(mg/L)	3.300	1.650	0.895	1.84	0.103
Adsorbent Amount (g)*Adsorbent Type	-0.453	-0.226	0.895	-0.25	0.807
Methyl red C(mg/L)*Adsorbent Type	-6.070	-3.035	0.895	-3.39	0.009
Adsorbent Amount (g)*Methyl red C(mg/L)*Adsorbent Type	-0.810	-0.405	0.895	-0.45	0.663

S = 3.58101 PRESS = 410.356

R-Sq = 88.43% R-Sq(pred) = 53.74% R-Sq(adj) = 78.32%

In Table 4, the most important parameters that affect the adsorption process's efficiency are adsorbent Type, methyl red concentration and interaction of methyl red concentration* adsorbent type. To effects these parameters, experiments were performed at different combinations of the physical parameters using statistically designed experiments.

Table 4 Estimated Effects and Coefficients for removal efficiency

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
Model	7	784.472	112.067	8.74	0.003
Linear	3	590.089	196.696	15.34	0.001
Adsorbent Amount (gr)	1	42.706	42.706	3.33	0.105
Methyl red C(mg/L)	1	267.323	267.323	20.85	0.002
Adsorbent Type	1	280.060	280.060	21.84	0.002
2-Way Interactions	3	191.759	63.920	4.98	0.031
Adsorbent Amount (g)*Methyl red C(mg/L)	1	43.560	43.560	3.40	0.103
Adsorbent Amount (g)*Adsorbent Type	1	0.819	0.819	0.06	0.807
Methyl red C(mg/L)*Adsorbent Type	1	147.380	147.380	11.49	0.009
3-Way Interaction	1	2.624	2.624	0.20	0.663
Adsorbent Amount (g)*Methyl red C(mg/L)*Adsorbent Type	1	2.624	2.624	0.20	0.663
Error	8	102.589	12.824	-	-
Total	15	887.060	-	-	-

A normal probability plot of the standardized effects, which is to determine the statistical significance of both primary and interaction effects, is given in Figure 3. The insignificant effects will fall along a line; on the other hand, and the significant effects will stray farther from the line. According to Figure 3 and Figure 4, the main effects B and C and the interaction BC are statistically significant. Since B and C lie on the right-hand side of the line, their contributions have a positive effect on the model.

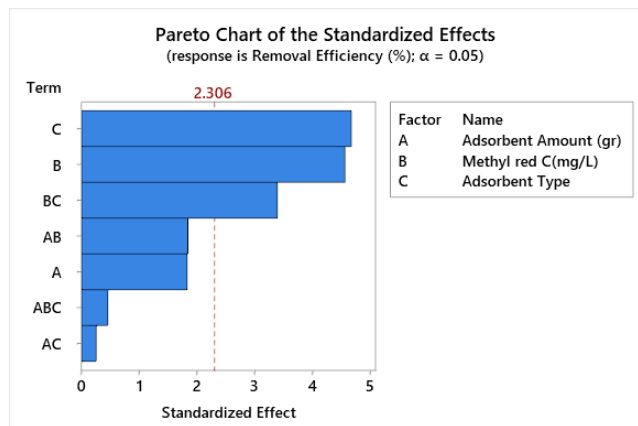


Fig. 3 Pareto chart of the standardized effects for methyl Red removal

The reverse is valid for the rest of the significant effects, which lie on the left-hand side. The adsorbent type appears to have the most enormous effect because it lies furthest from the line.

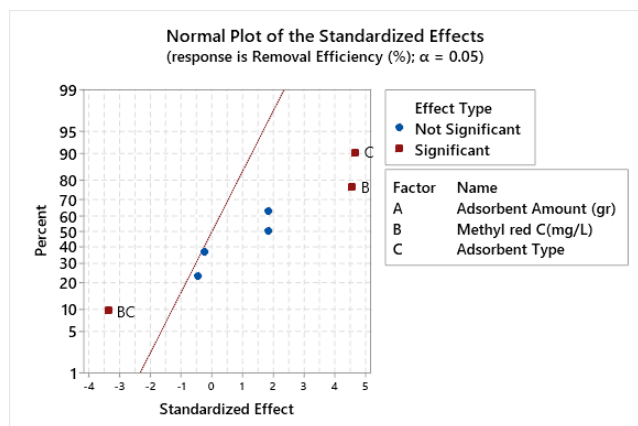


Fig. 4 Normal plot of the standardized effects for methyl red removal

Figure 5 shows the main effects plot, offering the effect of each variable on the response factor. The main effect is significant if the mean for one level of the factor is sufficiently different from the mean for another factor level. That is, lines with steeper slopes (up or down) have a more significant impact on the output than lines with little or no slope (horizontal). This type of figuration shows the contribution to the response factor of changing one of the

influential variables. When a factor’s effect is negative, removal efficiency decreases as the factor changes from low to high levels. In contrast, if the effect is positive, an increase in removal efficiency occurs for a high level of the same factor. If the magnitude of the main effect is small, the slope would be close to zero.

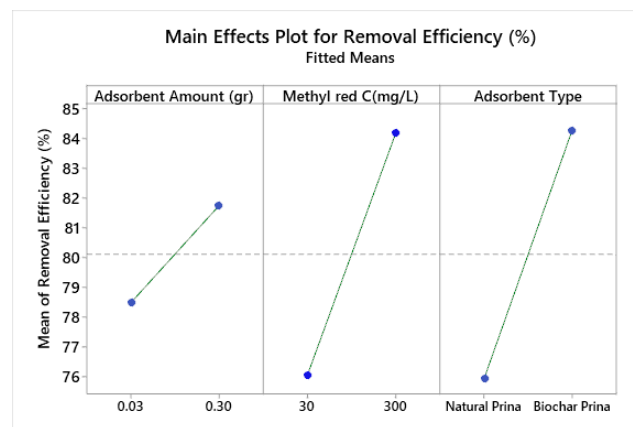


Fig. 5 Main Effects plot for Methyl Red removal efficiency from aqueous solutions

The interaction plot shows the possible interaction between the mean responses of the factors under assessment. An interaction plot circumstance the impact that changing the settings of one factor has on another factor. Graphically, two parallel lines of factors indicate no interaction between them; however, non-parallel lines suggest that they interact together. The interaction plot in Figure 6 confirms the interaction of methyl red concentration* adsorbent type is significant.

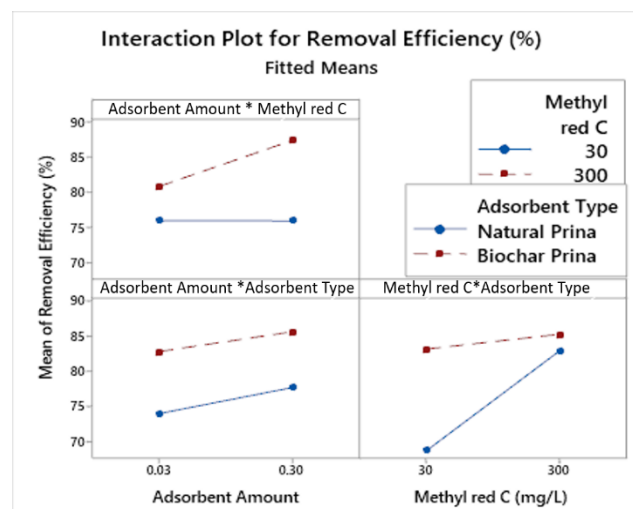


Fig. 6 Interaction plot for methyl red removal efficiency from aqueous solutions

To see the effects of interactions between experimental factors, a multi-vari chart was generated (Figure 7). From this chart, the effect of adsorbent type is observed for the biochar prina to be more efficient than the natural prina.

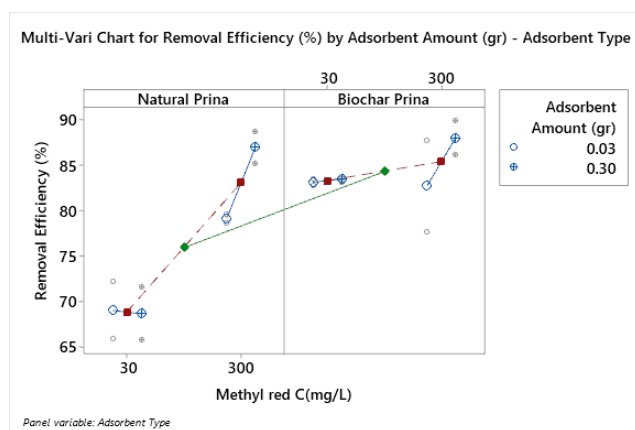


Fig. 7 Multi-Vari Chart for methyl red removal efficiency from aqueous solutions

4. Conclusion

The scope of this study was to investigate the effectiveness of the prina to remove methyl red dye ions from aqueous solutions. For this purpose, a 2^3 full factorial design (three factors, at two levels) was employed to evaluate the importance and interactions of adsorbent amount, initial dye concentration and adsorbent type. The factorial design results show that the adsorbent type (factor C) had the most potent effect on the methyl red dye's removal efficiency. The negative coefficient in the equation means that increasing factor C decreases removal efficiency. On the other hand, the positive sign of initial dye concentration (factor B) means a direct relation between this factor and the response. That is, increasing adsorbent amount increases removal efficiency. This study clearly shows that the interaction between adsorbent type and initial dye concentration was significant for the removal efficiency of methyl red ions.

Authors' contributions: SED was interested in performing the experiments, calculating the results, interpreting the data and arranging them according to the format. YT was interested in applying the experimental results to the model program and preparing the graphics. SC was interested in organizing the study.

Conflict of interest disclosure: Our work has not been carried out with any organization or employees.

References

- Ai M, Yang G, Zhang R. 2006. Minimum aberration blocking of regular mixed factorial designs. *J Stat Plan Inference*. 136:1493–1511.
- Erbas O, Semra OH. 2006. *Experimental Schemes and Statistical Analysis*. Gazi Bokstore, pp 62-65.
- Iram M, Guo C, Guan Y, Ishfaq A, Liu H. 2010. Adsorption and magnetic removal of neutral red dye from aqueous solution using Fe_3O_4 hollow nanospheres. *J Hazard Mater*. 181:1039-1050.
- Jaikumar V, Ramamurthi V. 2009. Statistical analysis and optimization of acid dye biosorption by brewery waste biomass using response surface methodology. *Modern Appl Sci*. 4:71-84.

Kose TE. 2008. Agricultural residue anion exchanger for removal of dyestuff from wastewater using full factorial design. *Desal*. 222:323-330.

Lian L, Guo L, Wang A. 2009. Use of $CaCl_2$ modified bentonite for removal of Congo red dye from aqueous solutions, *Desal*. 249:797-801.

Luo P, Zhao Y, Zhang B, Liu J, Yang Y, Liu J. 2010. Study on the adsorption of Neutral Red dye from aqueous solution onto halloysite nanotubes. *Water Res*. 44:1489-1497.

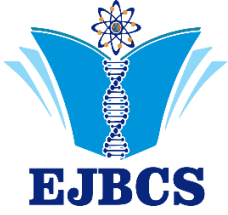
Montgomery D, Runger G, Hubele N. 2001. *Engineering Statistics*. John Wiley & Sons, New York, 2:24-28.

Senoglu B, Acitas S. 2014. *Statistical Experiment Design Fixed Effect Models*. Nobel, pp 12-19.

Tibet Y, Coruh S. 2017. Immobilisation and leaching performance of lead-acid batteries smelting slag using natural and waste materials. *Glob Nest J*. 19:562–573.

Yin Y, Zhou J. 2015. Minimax design criterion for fractional factorial designs. *Ann Inst Stat Math*. 67:673–685.

Zhao S, Chen X. 2012. Mixed two-and four-level fractional factorial split-plot designs with clear effects. *J Stat Plan Infer*. 142:1789–1793.



La³⁺, Ho³⁺ katkılı seryum oksidin sol-jel yöntem ile sentezi: kafes kusurları ve optik özellikleri üzerindeki değişim

Rabia Kırkgöçüt^{1*}, Handan Özlü Torun²

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye

²Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Mühendislik Fakültesi, Enerji Sistemleri Mühendisliği Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye

*Corresponding author: rabiakrkgcit@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-0766-7214>

Received :10/05/2020
Accepted :25/12/2020

Özet: Fotokatalist çalışmalarda yarı iletken metal oksitler, boya bozunması için geniş ölçüde çalışılmaktadır. Bu amaçla La³⁺, Ho³⁺ katkılı seryum oksit toz parçacıkları sol-jel yöntem kullanılarak sentezlendi. Elde edilen örneğin kristal yapısı ve meydana gelebilecek olası farklı fazların incelenmesinde X-Işınları difraktometresi (XRD) kullanıldı. Yüzey morfolojisi SEM ile karakterize edildi. Sıcaklığa bağlı olarak kütle kayıplarını, termal davranışını TG/DTA ile analiz edildi. Oluşan yapının simetri özelliklerini farklı titreşim modlarının görünümünü ile yapıda oluşan bozunma/ kusur hakkında bilgi edinmek için Raman analizi kullanıldı. Farklı sıcaklıklarda kalsine edilen Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O₂ bileşiğinin UV-vis spektroskopisi çalışmalarında kirletici materyal olarak metilen mavisi üzerin bozucu etkisini incelemek için 5 ppm miktarda ölçüm yapıldı. İncelenen tüm katalizörler iyi bozunmanın 1000 °C'de kalsine edilmiş 30 mg Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O₂ bileşiğine ait olduğunu ve yaklaşık% 47 olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Fotokatalitik Aktivite, Katkılı CeO₂, UV-Vis Spektroskopisi, Raman, Bandgap

Synthesis of La³⁺, Ho³⁺ Doped Cerium Oxide by Sol-Gel Method: Lattice in Cage Defects and Optical Properties

Abstract: Semiconductor metal oxides are widely studied in photocatalytic studies for dyestuff degradation. For this purpose, La³⁺, Ho³⁺ doped cerium oxide powder particles were synthesized using the sol-gel method. The crystal structure and possible different phases of the sample obtained were examined using X-Rays diffractometry (XRD). Surface morphology was characterized by SEM. Depending on the temperature, mass losses and thermal behavior were analyzed with TG / DTA. Raman analysis was used to examine the symmetry characteristics of the resulting structure, the appearance of different vibration modes and the degradation / defect in the structure. In order to investigate the photodegrading ability of the Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O₂ compound which was calcined at different temperatures on the methylene blue dye, quantitative measurement was done at a concentration of 5 ppm in the UV-vis Spectroscopy studies. All the catalysts studied showed the good degradation belonged to 30 mg Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O₂ compound calcined at 1000 °C and was approximately 47%.

Keywords: Photocatalytic Activity, Doped CeO₂, UV-vis spectroscopy, Raman, Bandgap

1. Giriş

Tekstil, ilaç ve kağıt endüstrilerinden salınan organik boyalar ve ağır metal iyonları son derece toksik ve kanserojendir (Magdalane ve ark. 2018; Gnanam ve Rajendran, 2018; Ali ve ark. 2018). Organik boya kirleticilerinin atık suya atılması kararlı yapıda olmaları nedeniyle potansiyel bir tehlike oluşturmaktadırlar (Chahal ve ark. 2019; ALI ve ark.2018). Bu nedenle, bu boya içeriğini bozan fotokatalitik malzemeleri geliştirmek için

yapılan araştırmalara dikkat çekmiştir (Kaviyarasu ve ark. 2015). Son yıllarda yarı-iletken ve metallerin yüzey kimyası, partikül boyutunun ve partikül düzenlerinin kontrolü, kimyasal reaktivitelerinin ve fotokatalitik aktivitelerinin artırılması bakımından büyük ilgi görmektedir (Bellardita ve ark.2020 ; George ve ark.2020; Amar ve ark.2020; Srisuvetha ve ark.2020) . Yarı iletkenlerin fotokatalitik aktivitesini arttırmak amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır (Chand ve Singh, 2020).

Bunlara; katalizör yüzeyinin modifiye edilmesi, katalizöre bir geçiş metalinin dop edilmesi, katalizöre metal iyonu aşılması, aktif karbon ile kaplama metal oksit ekleme, polimerlerle yüzey modifikasyonu, azot, karbon gibi ametallerle katkılandırma gibi yöntemler örnek verilebilir (Liyange ve ark.2014; Wang ve ark.2014; Yang ve ark.2019). Yüzey modifiye edicileri ile yüzey davranışı değiştirilerek yarıiletkenlerin fotokatalitik reaktivitesi arttırılabilmekte, optik ve redoks özellikleri iyileştirilebilmektedir (Zhou ve ark.2019). Nadir toprak metal oksitler, 4f elektronların hapsedilmesinden dolayı benzersiz optik, elektronik, manyetik ve katalitik özelliklerinden dolayı optik iletişim, optik ekranlar, verimli fotokataliz , UV kalkanı ve tıbbi teşhis gibi birçok pratik uygulamaya yol açmaktadır (Hou ve ark.2019; Qi ve ark.2019; Fei ve ark.2001). Seryum oksit (CeO_2) tabanlı malzemeler eşsiz özelliklerinden dolayı optoelektronik (Trogadas ve ark.2011) , yakıt hücresi teknolojileri (Jasinski ve ark.2003) , gaz sensörleri (Saranya ve ark. 2014) , katı-hal elektrolit (Asaithambi ve ark.2020), ve fotokataliz gibi çeşitli alanlarda geniş uygulanabilirliğe sahiptir. Metilen mavisi, toksik bir boya değil, katyonik bir boya olan tekstil endüstrisinde kullanılan en yaygın boyalardan biridir. Bununla birlikte, canlılar üzerinde çok zararlı etkiler ortaya çıkarabilir. Teneffüs ettikten sonra insanlarda solunum, kusma, ishal ve bulantı gibi zorluklar görülebilir (Anantharaman ve ark.2020). Bu çalışmada saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ toz bileşikleri sol-jel yöntem ile sentezlendi. Hazırlanan toz örneklerin XRD, Raman, TG/DTA ile karakterize edildi. Son olarak, metilen mavisi boyanın degradasyonun farklı kalsinasyon sıcaklık etkinliği de incelendi.

2. Materyal ve Metot

2.1. Fotokatalizörün Sentez

Bu çalışmada elde edilecek örneğin homojen olması, yüksek saflıkta ve toz boyutunun mikron altında olması gibi avantajlarından dolayı sol-jel yöntem kullanılmıştır. Stokiyometrik miktarlarda seryum (III) nitrat hegzahidrat ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$), lantanyum (III) nitrat hegzahidrat ($La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$) ve holmiyum (III) nitrat pentahidrat ($Ho(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$) toz tuzlarını saf su içerisinde oda sıcaklığında sabit karıştırıcı altında çözülmüştür. Şelata maddesi olarak sitrik asit tozu kullanılmıştır. Etilen glikol çözeltiliye ilave edilerek çözelti homojen ve şeffaf hale getirilmiştir. Daha sonrasında behere termometre koyup sıcaklığı 80-90 °C aralığında sabit olacak şekilde yaklaşık 2,5 saat uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem basamakları saf CeO_2 sentezlemek içinde kullanılmıştır. Elde edilen saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ toz örnekleri ön kurutma işlemi sonrasında 800 °C ve 1000 °C ısıl işleme tabi tutuldu ve karakterizasyon analizleri için hazır hale getirildi. Özetle sentez işlemi şematik olarak Şekil 1'de gösterilmektedir.

2.2. Fotokatalitik Aktivite ve Metilen Mavisi

Bu deneysel çalışmada 800 °C ve 1000 °C ısıl işleme tabi tutulan saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiklerinin fotokatalitik aktiviteleri, görünür ışık aydınlatması altında 300 W xenon lamba kullanılarak metilen mavisinin foto

parçalanması ile incelendi. 30 mg ve 60 mg miktarlarda fotokatalizörler 5 ppm metilen mavisi içeren 50 mL sulu çözelti içinde süspansiyon edildi. Fotokatalizörlerin MB yüzeyinde adsorpsiyon / desorpsiyon dengesini sağlamak için karanlıkta 30 dakika bekletildi. Ölçümlerde çözeltilerden 2 ml'lik numuneler alınarak kullanıldı. Çözelti numunelerinin absorbansının metilen mavisinin (MB) karakteristik absorpsiyon 0 dakikadan başlayarak her 10 dakika bir (300-800 nm) dalga boyu aralığında 60 dk'ya kadar ölçümler yapıldı. 60 dk'dan sonra 20 dk aralıklarda 2 ölçüm daha alıp 100 dk'da analiz sonlandırılmıştır. UV-spektrofotometresi (UV-1800 Shimadzu UV spectrophotometer) kullanarak izlendi. MB için yüzde renk azalması verimi aşağıda (1) denklemi gösterimi;

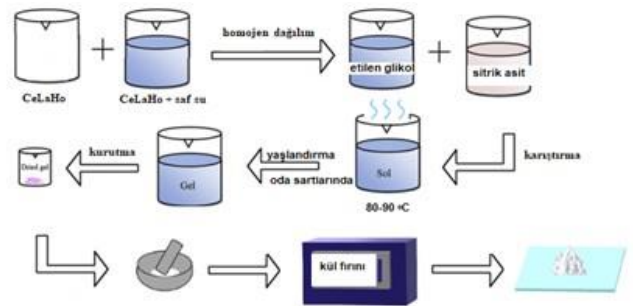
$$\text{Bozunma aktivitesi} = 1 - \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

Şeklinde tanımlanır (Kerli ve ark.2019). Burada C_0 MB'nun başlangıç konsantrasyonunu, C fotokatalitik reaksiyon sonrası konsantrasyonunu ifade eder.

Renk bozucu olarak kullanılan boyar maddelerin sıvı-katı ara yüzeyde heterojen katalitik renk giderimi, Langmuir-Hinshelwood reaksiyonların hız kinetik değişimi zamana bağlı olarak aşağıda verilen (2) denklemi;

$$\ln \frac{C_0}{C} = kt \quad (2)$$

ile hesaplanmaktadır. Denklem eğimi (Zhang ve ark.2013) 1. derece hız sabiti değeridir (k , dk^{-1}). C_0 ; başlangıç boyar madde derişimini, C ise t zamanındaki boyar madde derişimini ifade etmektedir.



Şekil 1. Sol-jel yöntem ile saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ toz bileşiklerinin sentez aşamaları gösterimi.

2.3. Karakterizasyon Aşamaları

Kristal yapıyı ve faz saflığını incelemek için XRD tekniği kullanıldı. Kalsine edilmiş tozlar, XRD (Philips X' Pert Pro, $\lambda = 0.154056$ nm ,Cu-K α radiation) tarafından çalışıldı. Elde edilen ürünün kristal büyüklüğü, Debye-Scherrer eşitliği kullanılarak genişleyen X-ışını difraksiyonu (XRD) kesişme çizgisi ile belirlendi. Oda sıcaklığında μ - Raman spectroscopy analizi, 1300-100 cm^{-1} aralığında 785 nm He-Ne lazeri kullanılarak 2 saniyede portatif raman spektrometri (BWS465 B.W tek.İnc.) ile analiz yapıldı. Termogravimetrik analiz SEIKO Exstar TG-DTA sistemi ile yapıldı. Sıcaklık aralığı 10 °C / dk idi. TG ve DTA' n

sonuçları sıcaklığın bir fonksiyonu olarak çizildi. Farklı sıcaklıklarda sinterlenmiş örneklerin morfolojisi ve mikro yapısını tanımlamak amacıyla Zeiss EVO 10LS marka mikroskop (SEM) ve yüzey analizi elemental analizinin değerlendirilmesi için de EDX analizinden yararlandı.

3. Bulgular ve Tartışma

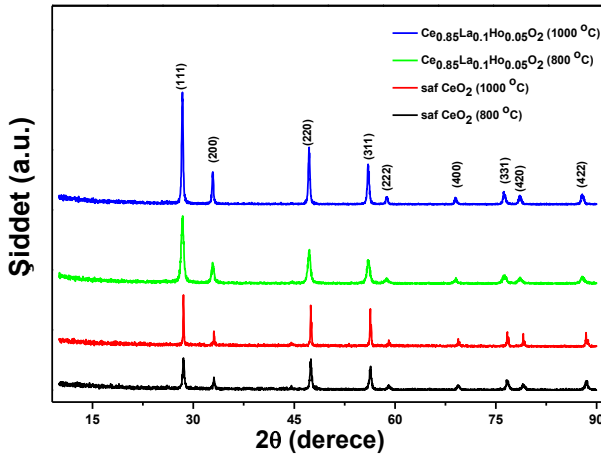
3.1. XRD Analizi

800-1000 °C’de ısıtılma tabii tutulan saf CeO₂ ve Ce_{0,85}La_{0,1}Ho_{0,05}O₂ katı toz tozlarının kristal yapısını kontrol etmek, birim hücre parametresini, ortalama kristal boyutunu ve birim hacmini bulmak için XRD analizi yapıldı. Kalsine edilmiş tozlar, XRD (Philips X’ Pert Pro, $\lambda = 0.154056$ nm ,Cu-K α radiation) tarafından çalışıldı. Ölçümler bakır X-ışınları tüpü, kullanılarak $2\theta=9^{\circ}$ - 90° açı aralığında yapıldı. Kristal büyüklüğü en yüksek bağlı şiddete sahip pikler referans alınarak, aşağıda verilen Debye-Scherrer denklemi (3) kullanılarak hesaplandı.

Bu formül aşağıda verilmiştir;

$$D=k\lambda/\beta\cos\theta \quad (3)$$

Burada k, Debye Scherrer sabiti (0,89), λ enerjinin dalga boyu, β ’ FWHM değeri ve θ ’ ise Bragg açısıdır.



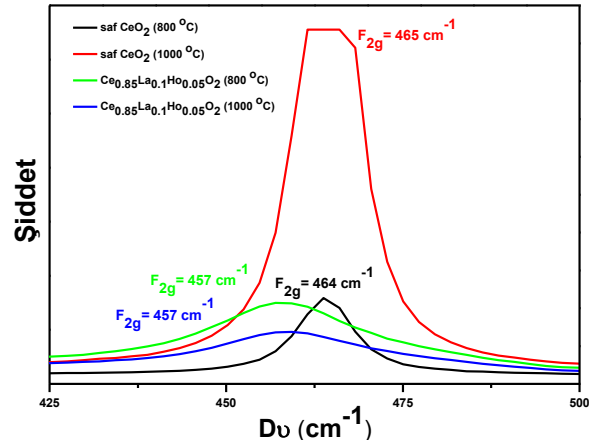
Şekil 2. Saf CeO₂ ile Ce_{0,85}La_{0,1}Ho_{0,05}O₂ katı toz bileşiklerinin 800 °C ve 1000 °C kalsinasyon sıcaklıklarındaki x-ışını kırınımı deseni.

Şekil 2’deki XRD düzlemini incelediğimizde sıcaklık arttıkça belirgin yüksek şiddet ve keskin dar pikler görülmektedir. Elde edilen kristal yapı kübik fazdadır. Bu pikler referans kod: 98-015-5618 ile uyumludur. Ana faz olan CeO₂ içerisine katılan La³⁺ ve Ho³⁺ iyonlarının yarıçapı Ce⁴⁺ iyon yarıçapından daha büyüktür. Bu da 2θ açısının sola kaymasına neden olmaktadır (Şişman ve Biçer, 2011). Aynı zamanda eklenen türler birim hücre parametresini değiştirmektedir. Saf CeO₂’nin oda sıcaklığında birim hücre parametresi 5.411 Å ‘dir.

Katkılama ile birim hücre parametresi 5.446 Å yükselmiştir. Kristal boyutuna etki eden faktörlerde sinterleme sıcaklıkları da önemlidir. Birim hücre parametreleri, katkı yarıçapının ve sıcaklık artışıyla kristal yapı kararlılığında artış olmaktadır (Özlü Torun ve Kırkgeçit, 2019). En yüksek bağlı şiddete sahip pikler referans alınarak, Debye-Scherrer eşitliğinden (denklem 3) kristal boyutu ortalama 35 nm olarak hesaplandı.

3.2. Raman Spektroskopisi Analizi

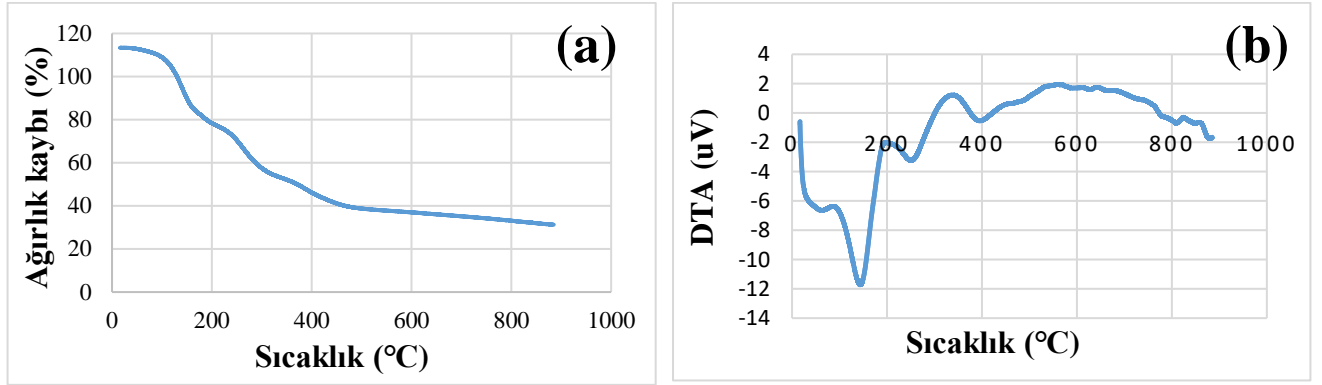
Raman saçılım spektroskopisi, oluşan yapının simetri özelliklerini farklı titreşim modlarının görünümünü ile kafes yapısındaki bozunma/ kusur hakkında bilgi verir. Saf CeO₂ ve Ce_{0,85}La_{0,1}Ho_{0,05}O₂ bileşiklerinin kimyasal yapı analizleri çözünürlüğü 3 cm⁻¹ olan 785 nm’lik dalga boyuna sahip lazer gücünü 20 mW’lik diyot lazerli portative olarak Raman spektroskopisiyle incelenildi. Şekil 3’ü incelediğimizde 1000 °C’de ısıtılma tabii tutulan saf CeO₂, 465 cm⁻¹ ‘de F_{2g} tek bir keskin ve şiddetli pik vermektedir (Govindarasu ve ark.2019). 800 °C’de ise F_{2g} değeri 464 cm⁻¹ gerilemesi olmaktadır. Katkılama ile F_{2g} değeri 457 cm⁻¹ değerini görülmektedir. Bu durum ise Raman piklerinin genişliğindeki ve şiddetindeki değişiklik, fonon yakalama etkisi, kafes gerilmesi ve oksijen boşluklarından kaynaklanmaktadır (Ratnayake ve ark.2020). F_{2g} modundaki değişiklikler, saf CeO₂ ‘ye La³⁺ ile Ho³⁺ ilavesi ve ısıtılma sıcaklığı sadece O atomları hareket ettirdiğinden, titreşim modu katyon kütlelerinden neredeyse bağımsızdır.



Şekil 3. 800°C ve 1000°C ısıtılma tabii tutulan saf CeO₂ ve Ce_{0,85}La_{0,1}Ho_{0,05}O₂ bileşiklerine ait Raman spektrumu.

3.3. TG/DTA Analizi

Termogravimetri (TG) ölçüm ile oluşan örneğin sıcaklığa bağlı olarak kütle kayıplarını (su kaybı, organik maddenin uzaklaşması) değerlendirmemize yardımcı olur. Diferansiyel termal analiz (DTA) ile, ekzotermik ya da endotermik reaksiyonlar sonucu oluşan sıcaklık değişimleri inceleriz. Ce_{0,85}La_{0,1}Ho_{0,05}O₂ katı toz elektrolitin DTA ve TG eğrileri Şekil 4’te gösterilmektedir.



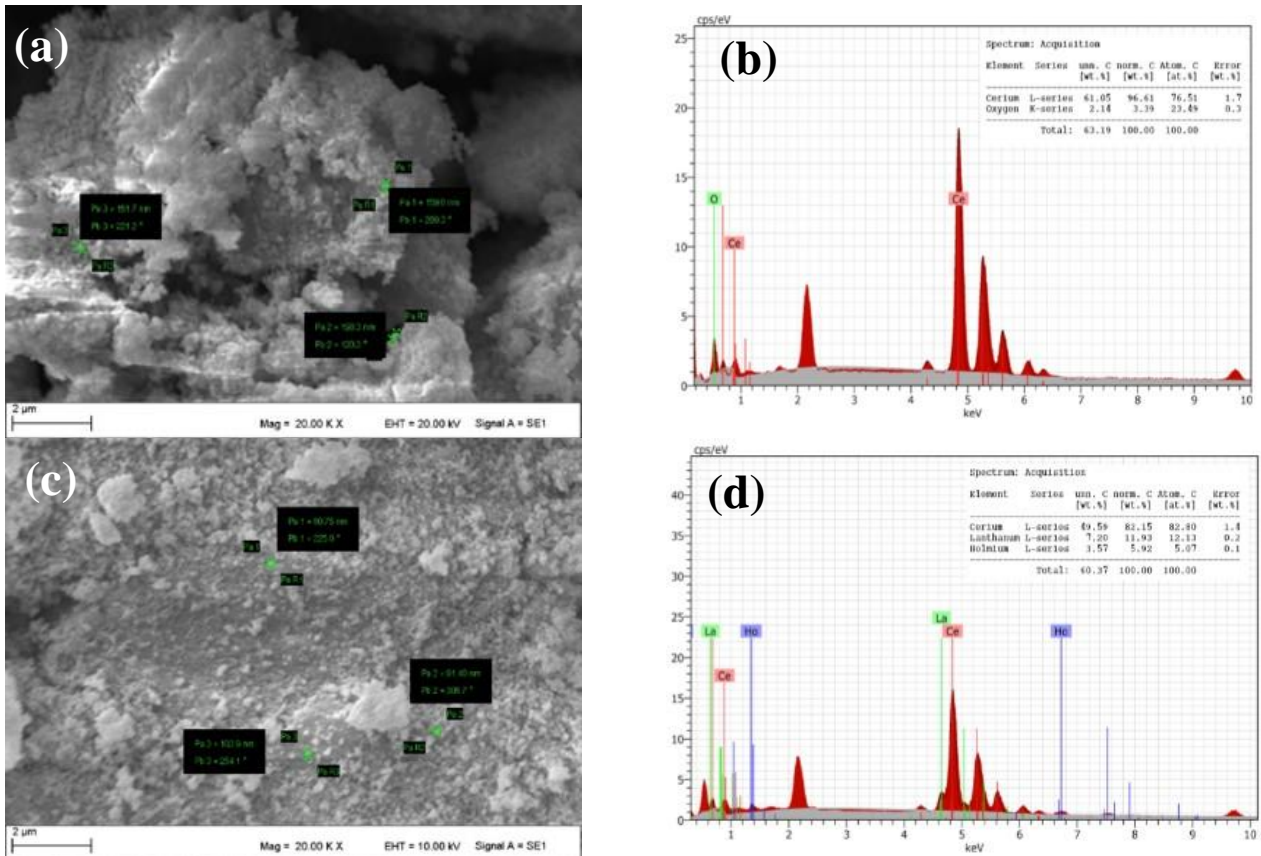
Şekil 4. Sol-jel yöntemiyle hazırlanmış $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiğinin (a) TG analizi (b) DTA analizi.

Şekil 4'ü incelediğimizde TG eğrisinde 30°C-140°C sıcaklıkları arasındaki ilk kütle kaybı H_2O molekülünün uzaklaştırıldığını göstermektedir. DTA eğrisinde bu sıcaklık aralığında zayıf şiddette endotermik pik gözlenmektedir. 200 °C sonrasında sıcaklık artışı ile ikinci bozunma kademesinde yapıdan NO_2 ve O_2 ortandan uzaklaşmaktadır. Bu durum DTA eğrisinde görülen zayıf ekzotermik pikin varlığı ile doğrulanmaktadır. 600 °C sonrasında sıcaklık artışında önemli bir ağırlık değişiminin olmaması CeO_2 oluşumunun tamamlandığı anlaşıldı. Sonuç olarak yüksek sıcaklıklarda yapıda hiçbir bozulma türü

oluşturacak farklı faz kalmadığı için tez fazlı bir bileşik oluştu.

3.4. SEM/EDX Analizi

SEM analizi numunelerin morfolojik özelliklerini incelemek için kullanılır. EDX analiz ile numune içindeki elementlerin yüzdelerini doğrulamak için kullanılır. Şekil 5'te 1000 °C kalsine edilen saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiklerinin SEM/EDX sonuçları gösterilmektedir.



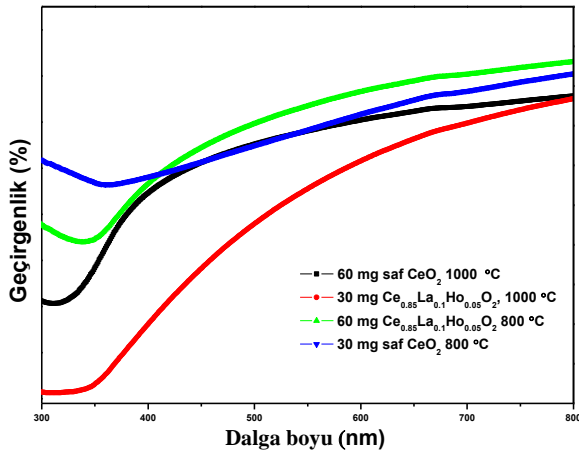
Şekil 5. Saf CeO_2 (a) SEM görüntüsü deseni ve (b) EDX analizi, $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiğinin (c) SEM görüntüsü deseni ve (d) EDX analizi.

SEM ölçümlerinden önce, yükleme etkilerini azaltmak için numuneler altınla kaplanır. Saf CeO_2 'in ortalama tane boyutu 92 nm, $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ 'in ise 170 nm'dir. SEM sonuçlarından açıkça görüldüğü üzere $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ bileşiği, saf CeO_2 'ye kıyasla partikül boyutunda küçültme görülmektedir.

EDX analiz sonucu ise hazırlanan malzemelerdeki başlangıç malzemeleri olan Ce, La ve Ho elementlerinin sentezlenen yapılarda varlığını doğrulamaktadır.

3.5. Yasak Band Aralığı

Fotokatalitik aktivite esas olarak uygun enerji bant boşluğuna sahip heterojen katalizörlerin yarı iletken yapısına dayanmaktadır. Saf CeO_2 ve $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ bileşiklerinin geçirgenlik özellikleri UV-Vis spektrofotometre ile analiz edildi (Şekil 6).



Şekil 6. Saf CeO_2 ve $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ bileşiklerinin geçirgenlik değişimi.

Şekil 6'yı incelediğimizde sıcaklık artmasıyla geçirgenliklerinin önemli ölçüde düşmektedir. Fotokataliz miktarı saf seryum oksitte artması ile geçirgenliği düşürürken, katkılı CeO_2 madde miktarındaki artış geçirgenliği düşürmemektedir.

Bu sonuçlardan en iyi olan 30 mg $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ daha yüksek dalga boylarındaki ışığı soğurabilmesini sağladı. Şekil 7'de saf CeO_2 ve $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ bileşiklerinin absorpsiyon ve yasak enerji aralığı (E_g) değerleri verilmektedir. Şekil 7'yi incelediğimizde saf CeO_2 'in yasak enerji aralığının 2.8 eV'den sıcaklık artışı ile 2.10 eV değerine düştüğü görülmektedir. Ayrıca katkılama ile ve sıcaklık artışıyla 1.88 eV'den 1.46 eV'e azalmalar görüldü. Band boşluklarından da anlaşılacağı gibi saf CeO_2 ve $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ bileşikleri hem UV bölgesinde hem de görünür bölgede aktifleşebilen bir yapıya sahiptir.

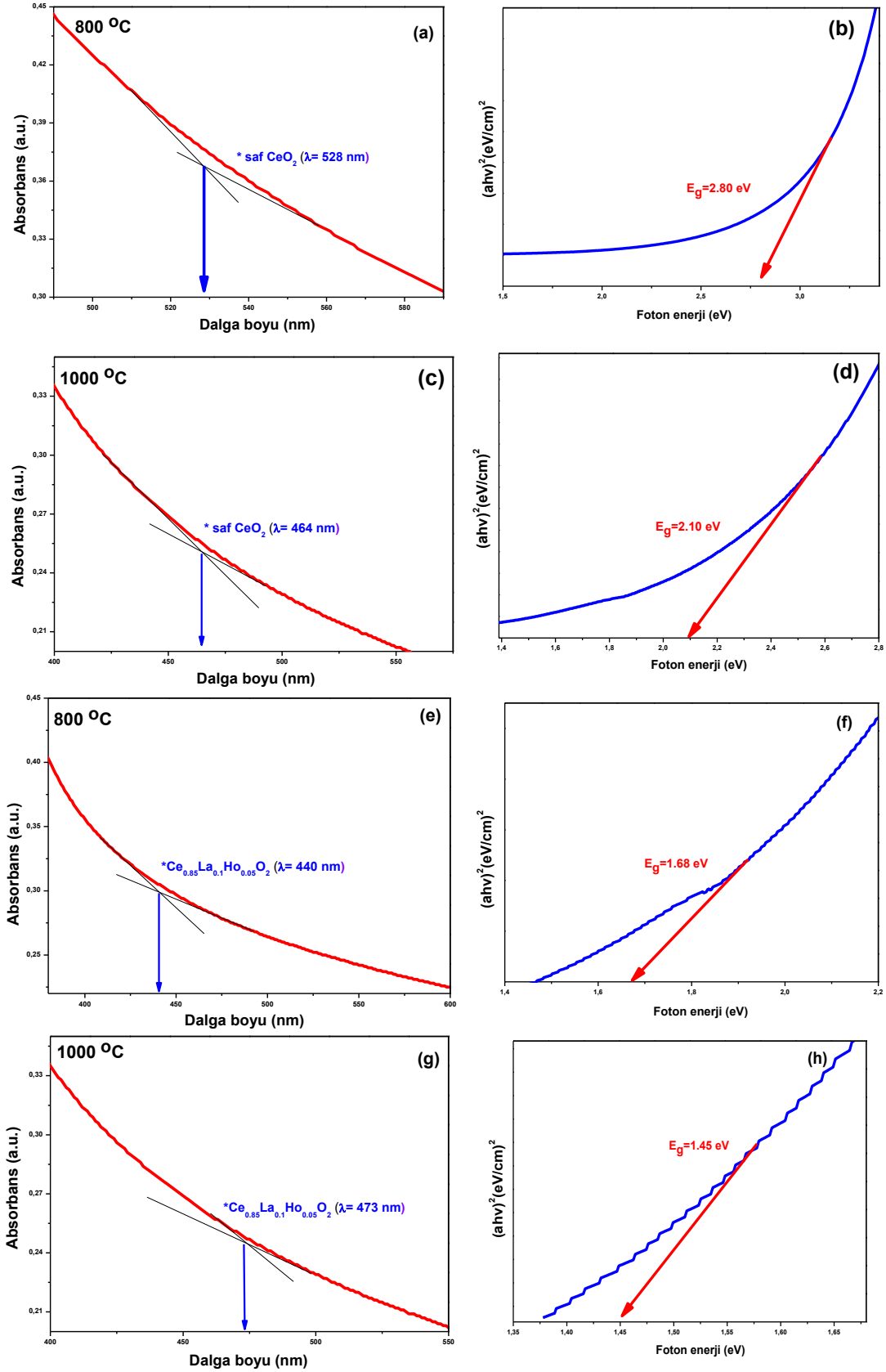
3.6. Uv-vis spektroskopisi

Saf CeO_2 ve $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ bileşiklerinin morfolojik, spektroskopik, yapısal vb. olarak karakterizasyon analizlerini tamamladıktan sonra tekstil endüstrisinde boyar madde olarak kullanılan metilen mavisi üzerine etkisini miktar ve sıcaklık farkı (Şekil 8.) etkisini incelemek için fotokatalizör olarak kullanıldı.

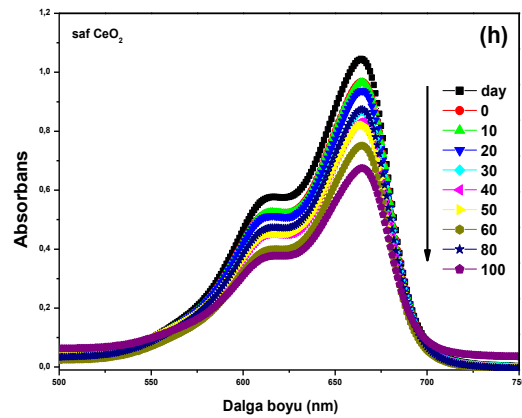
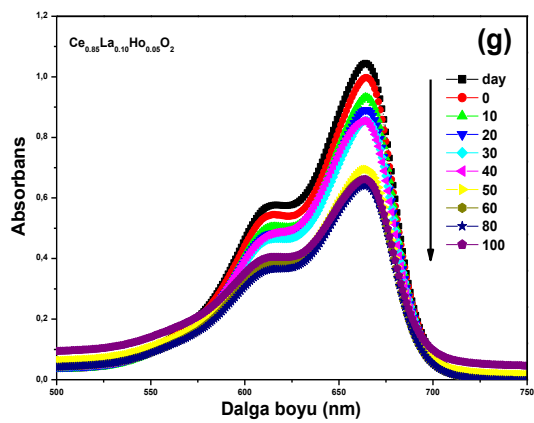
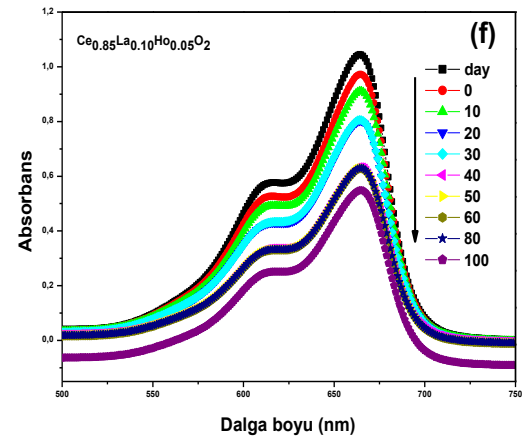
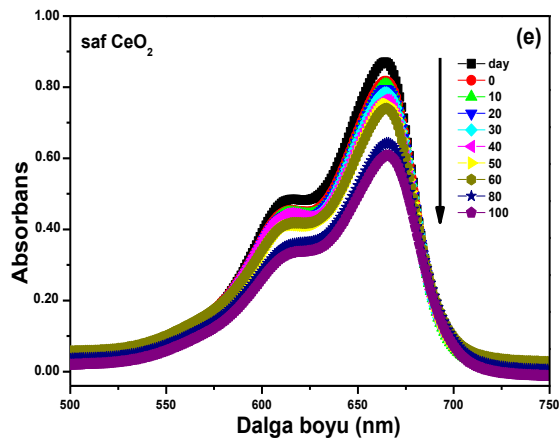
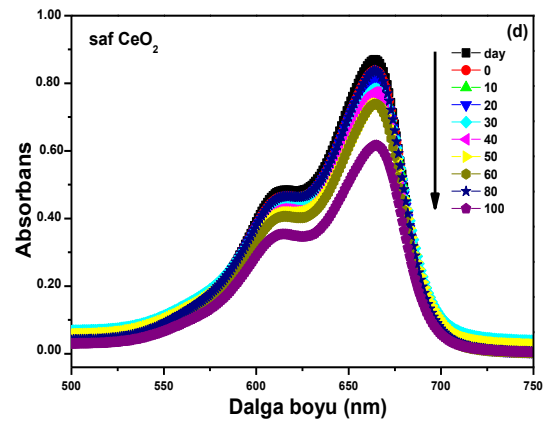
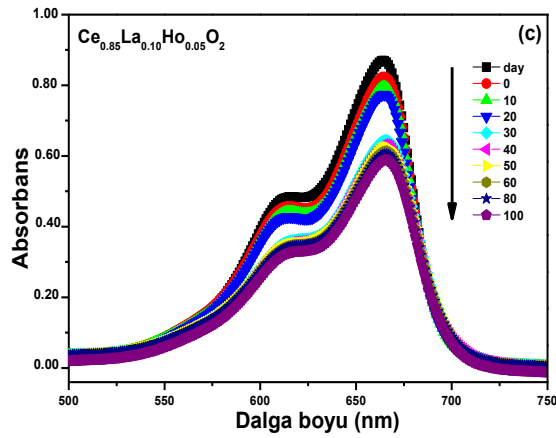
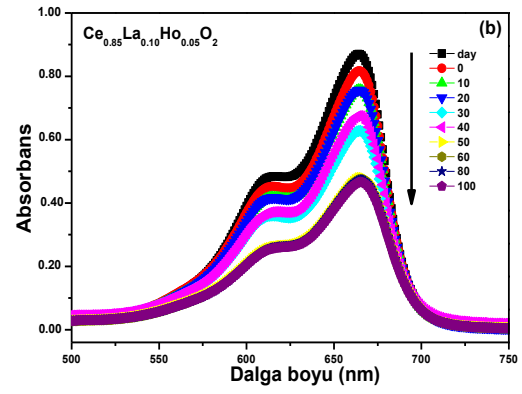
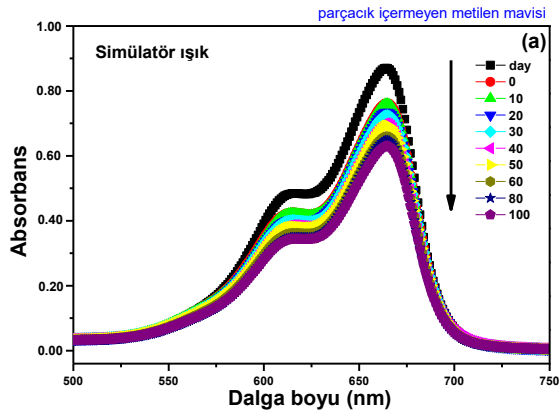
Şekil 9'u incelediğimizde saf CeO_2 ve $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ bileşiklerinin kinetik değişimini incelediğimizde parçalanma verimine paralel olarak sıcaklık artışı reaksiyon hız sabitini arttırmaktadır ve metilen mavisinin bozunmasını olumlu etkilemektedir. Metilen mavisi dalga boyuna karşı absorpsiyon spektrumunu incelediğimizde tüm numuneler için max. absorpsiyon 664 nm dalga boyunda gerçekleşmiştir. Değerleri yerine koyduğumuzda yüzde renk giderimi ve kinetik hız değişim aşağıdaki Tablo 1'deki veriler elde edildi.

Tablo 1. 800 °C ve 1000 °C ısıya tabi tutulan saf CeO_2 ve $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$ 30 mg ve 60 mg fotokatalizörlerin renk giderim yüzdesi ve fotokatalizörün reaksiyon kinetik değişimi.

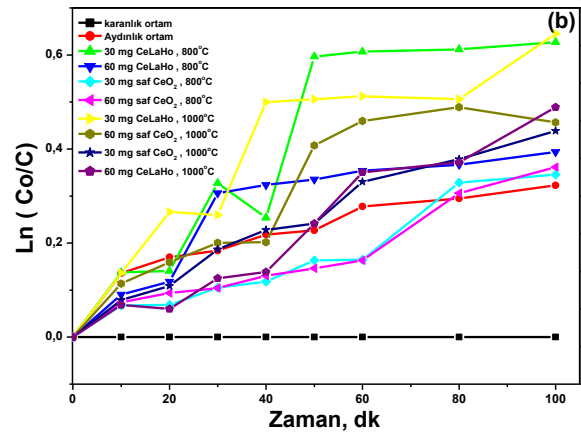
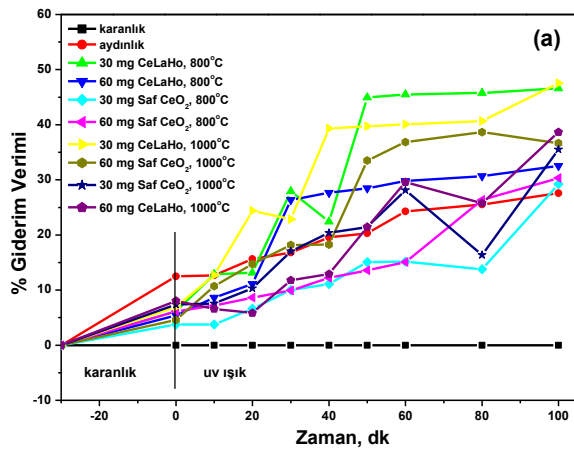
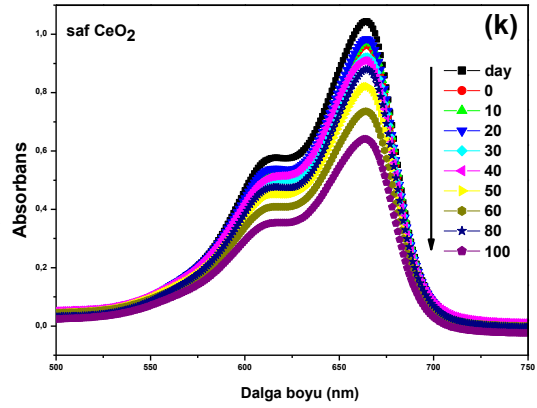
No.	Numune	Fotokatalitik Aktivitesi	Kinetik Değişim
1.	sun (metilen mavisi parçacıksız)	27	$3,2 \times 10^{-3}$
2.	30 mg $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$, 800 °C	46	$6,2 \times 10^{-3}$
3.	60 mg $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$, 800 °C	32	$3,9 \times 10^{-3}$
4.	30 mg saf CeO_2 , 800 °C	29	$3,4 \times 10^{-3}$
5.	60 mg saf CeO_2 , 800 °C	31	$3,6 \times 10^{-3}$
6.	30 mg $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$, 1000 °C	47	$6,4 \times 10^{-3}$
7.	60 mg $\text{Ce}_{0.85}\text{La}_{0.1}\text{Ho}_{0.05}\text{O}_2$, 1000 °C	38	$4,5 \times 10^{-3}$
8.	30 mg saf CeO_2 , 1000 °C	35	$4,3 \times 10^{-3}$
9.	60 mg saf CeO_2 , 1000 °C	36	$4,8 \times 10^{-3}$



Şekil 7. 800 °C de kalsine edilmiş; (a) Saf CeO₂ UV-görünür absorpsiyon spektrumu, (b) optik bant boşluğunu hesaplamak için çizilen $(\alpha h\nu)^2 = 2\alpha h\nu E_g$ grafiği. 1000 °C de kalsine edilmiş; (c) Saf CeO₂ UV-görünür absorpsiyon spektrumu, (d) optik bant boşluğunu hesaplamak için çizilen $(\alpha h\nu)^2 = 2\alpha h\nu E_g$ grafiği. 800 °C de kalsine edilmiş; (e) Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O₂, UV-görünür absorpsiyon spektrumu, (f) optik bant boşluğunu hesaplamak için çizilen $(\alpha h\nu)^2 = 2\alpha h\nu E_g$ grafiği. 1000 °C de kalsine edilmiş; (g) Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O₂, UV-görünür absorpsiyon spektrumu, (h) optik bant boşluğunu hesaplamak için çizilen $(\alpha h\nu)^2 = 2\alpha h\nu E_g$ grafiği.



Şekil 8. Fotokatalitik bozunma aktivitesi grafikleri; (a) sun (b) 30 mg $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$, 800 °C (c) 60 mg $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$, 800 °C (d) 30 mg saf CeO_2 , 800 °C (e) 60 mg saf CeO_2 , 800 °C (f) 30 mg $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$, 1000 °C (g) 60 mg $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$, 1000 °C (h) 30 mg saf CeO_2 , 1000 °C (k) 60 mg saf CeO_2 , 1000 °C



Şekil 9. (a) Saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiklerinin parçalanma verimi, (b) Saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiklerinin kinetik hız değişimi.

Saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiklerinin parçalanma verimi ile fotokatalizör reaksiyon kinetik hız değişimi Şekil 9'da verilmektedir.

4. SONUÇ

Sol-jel yöntemi ile kübik yapılu saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiği elde edildi. Bu pikler referans kod: 98-015-5618 ile uyumludur. Sıcaklık arttıkça belirgin yüksek şiddetlerde keskin dar pikler görülmektedir. Sıcaklık değişimi kristal fazı bozmadı. 1000 °C ısı işleme tabi tutulan saf CeO_2 , 465 cm^{-1} 'de F_{2g} tek bir keskin ve şiddetli pik vermektedir. 800 °C 'de ise F_{2g} değeri 464 cm^{-1} gerilemesi oldu. Katkılama ile F_{2g} değeri 457 cm^{-1} değerini görüldü. TG/DTA analizi sonucunda ise yüksek sıcaklıklarda yapıda hiçbir bozulma türü oluşturacak farklı faz kalmadığı için tez fazlı bir bileşik oluşmuştur. SEM sonuçlarından $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiği, saf CeO_2 'ye

TEŞEKKÜR

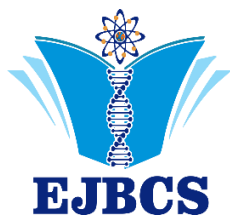
Bu çalışma 2019 / 5-7 YLS Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından kısmen finansal olarak desteklenmiştir.

kıyasla partikül boyutunda küçülme meydana geldiği görülmektedir. EDX analiz sonucu ise hazırlanan malzemelerdeki başlangıç malzemeleri olan Ce, La ve Ho elementlerinin sentezlenen yapılarda varlığını doğrulamaktadır. Saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiklerinin geçirgenlik değişiminde sıcaklık artmasıyla geçirgenliklerinin önemli ölçüde düşürülmektedir. Bu sonuçlardan en iyi olan 30 mg $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ daha yüksek dalga boylarındaki ışığı soğurabilmesini sağladı. Band boşluklarından da anlaşılacağı gibi saf CeO_2 ve $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşikleri hem UV bölgesinde hem de görünür bölgede aktifleşebilen bir yapıya sahiptir. Fotokatalitik aktivitesinde sıcaklık artışı ile renk bozunma verimi artış gösterdi. Saf CeO_2 , mg olarak arttırmak olumlu etkiledi. Ancak $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiğini olumsuz etkiledi. En iyi sonuç 1000 °C'de kalsine edilen 30 mg $Ce_{0.85}La_{0.1}Ho_{0.05}O_2$ bileşiği ait olup %47 fotokatalitik bozunma aktivitesi gösterdi.

KAYNAKLAR

- Alı S, Kumar R, Arya MC. 2018. Enhanced Photocatalytic Activity of Manganese-Doped Cerium Oxide Nanoparticles under Visible and UV Irradiation. Asian J Chem, 30(11): 2544-2550
- Ali S, Kumar R, Kadabinakatti SK, Arya MC. 2018. Enhanced UV and visible light—driven photocatalytic degradation of

- tartrazine by nickel-doped cerium oxide nanoparticles. *Mater Res Express*, 6(2):025513
- Amar IA, Harara HM, Baqul QA, Qadir A, Mabroukah A, Altohami FA, Saleh FA. 2020. Photocatalytic degradation of malachite green dye under UV light irradiation using calcium-doped ceria nanoparticles. *Chem Asian J*, 3(1):1-14
- Anantharaman A, Josephine BA, Teresita VM, Ajeesha TL, George M. 2019. Photo-Fenton Activity of Magnesium Substituted Cerium Ferrite Perovskites for Degradation of Methylene Blue via Sol-Gel Method. *J nanosci nanotechnology*, 19(8):5116-5129
- Asaithambi S, Sakthivel P, Karuppaiah M, Hayakawa Y, Loganathan A, Ravi G. 2020. Improved photocatalytic performance of nanostructured SnO₂ via addition of alkaline earth metals (Ba²⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺) under visible light irradiation. *Applied Physics A*, 126(4):1-12
- Bellardita M, Fiorenza R, Palmisano L, Scirè S. 2020. Photocatalytic and photothermocatalytic applications of cerium oxide-based materials. In *Cerium Oxide (CeO₂): Synthesis, Properties and Applications*, Elsevier, 109-167
- Chahal S, Rani N, Kumar A, Kumar P. 2019. Photocatalytic application of lithium doped cerium oxide nanoparticles upon UV light irradiation. In *AIP Conference Proceedings*, AIP Publishing LLC, 2115: 030605
- Chand P, Singh V. 2020. Enhanced visible-light photocatalytic activity of samarium-doped zinc oxide nanostructures. *J Rare Earths*, 38(1):29-38
- Fei G, Guo-Hua L, Jian-Hui Z, Fu-Guang Q, Zhen-Yu Y, Zhi-Kai L, Lan-Ying L. 2001. Growth and photoluminescence of epitaxial CeO₂ film on Si (111) substrate. *Chinese Phys Lett*, 18(3):443
- George SE, George M, Alex JJ, Aravind A, Sajan D, Vinitha G. 2020. Nonlinear optical and photocatalytic dye degradation of Co doped CeO₂ nanostructures synthesized through a modified combustion technique. *Ceram Int*, 46: 13932-13940
- Gnanam S, Rajendran V. 2018. Facile sol-gel preparation of Cd-doped cerium oxide (CeO₂) nanoparticles and their photocatalytic activities. *J Alloys Compd*, 735:1854-1862
- Govindarasu K, Gnanasekaran K, Balaraman S, Iruson B, Krishnamoorthy S, Padmaraj B, Dhananjayan S. 2019. Study on Enhanced Antibacterial and Cytotoxicity of Pure and Cadmium Doped Cerium Oxide against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Soft Nanosci Lett*, 9(1):1-16
- Hou H, Watanabe K, Furuno H, Nishikawa M, Saito N. 2019. Photocatalytic Overall Water Splitting on RuO₂-loaded Sm³⁺-doped CeO₂ with Heterogenous Doping Structure. *Chem Lett*, 48(3):200-203
- Jasinski P, Suzuki T, Anderson HU. 2003. Nanocrystalline undoped ceria oxygen sensor. *Sensors Actuators B*, 95(1-3): 73-77
- Kaviyarasu K, Magdalane C, Manikandan E, Jayachandran M, Ladchumananandasivam R, Neelamani S, Maaza M. 2015. Well-aligned graphene oxide nanosheets decorated with zinc oxide nanocrystals for high performance photocatalytic application. *Int J Nanosci*, 14(03):1550007
- Kerli S, Alver Ü, Eskalen H, Uruş S, Soğuksu AK. 2019. Structural and Morphological Properties of Boron Doped V₂O₅ Thin Films: Highly Efficient Photocatalytic Degradation of Methyl Blue. *Russ J Appl Chem*, 92(2):304-309
- Liyanage AD, Perera SD, Tan K, Chabal Y, Balkus KJ. 2014. Synthesis, characterization, and photocatalytic activity of Y-doped CeO₂ nanorods. *ACS Catalysis*, 4(2):577-584
- Magdalane CM, Kaviyarasu K, Raja A, Arularasu MV, Mola GT, Isaev AB, Maaza M. 2018. Photocatalytic decomposition effect of erbium doped cerium oxide nanostructures driven by visible light irradiation: investigation of cytotoxicity, antibacterial growth inhibition using catalyst. *J Photochem Photobiol B Biol*, 185:275-282
- Özlü Torun H, Kırkgeçit R. 2019. Synthesis and Characterization of Co-doped CeO₂ Ceramic Electrolyte for IT-SOFC. *Iran J Hydr Fuel Cell*, 6(2) :163-170
- Qi Y, Ye J, Zhang S, Tia Q, Xu N, Tian P, Ning G. 2019. Controllable synthesis of transition metal ion-doped CeO₂ micro/nanostructures for improving photocatalytic performance. *J Alloys Compd*, 782:780-788
- Ratnayake SP, Mantilaka MMMGPG, Sandaruwan C, Dahanayake D, Gunasekara YP, Jeyasakthy S, Silva KN. 2020. Low-temperature thermocatalytic particulate carbon decomposition via urea solution-combustion derived CeO₂ nanostructures. *J Rare Earths*, 1002-0721
- Saranya J, Ranjith KS, Saravanan P, Mangalaraj D, Kumar TR. 2014. Cobalt-doped cerium oxide nanoparticles: enhanced photocatalytic activity under UV and visible light irradiation. *Mater Sci Semicond Process*, 26:218-224
- Srisuvetha VT, Rayar SL, Shanthi G. (2020). Role of cerium (Ce) dopant on structural, optical and photocatalytic properties of MgO nanoparticles by wet chemical route. *J Mater Sci-Mater El*, 31(4):2799-2808
- Şişman İ, Biçer M. 2011. Structural, morphological and optical properties of Bi_{2-x}Sb_xSe₃ thin films grown by electrodeposition. *J Alloys Compd*, 509(5): 1538-1543
- Trogadas P, Parrondo J, Ramani V. 2011. Platinum supported on CeO₂ effectively scavenges free radicals within the electrolyte of an operating fuel cell. *Chem Commun*, 47(41):11549-11551
- Wang Y, Wang F, Chen Y, Zhang D, Li B, Kang S, Cui L. 2014. Enhanced photocatalytic performance of ordered mesoporous Fe-doped CeO₂ catalysts for the reduction of CO₂ with H₂O under simulated solar irradiation. *Applied Catalysis B*, 147: 602-609
- Yang H, Xu B, Yuan S, Zhang Q, Zhang M, Ohno T. 2019. Synthesis of Y-doped CeO₂/PCN nanocomposited photocatalyst with promoted photoredox performance. *Applied Catalysis B*, 243: 513-521
- Zhang D, Gong J, Ma J, Han G, Tong Z. 2013. A facile method for synthesis of N-doped ZnO mesoporous nanospheres and enhanced photocatalytic activity. *Dalton Trans*, 42(47): 16556-16561
- Zhou F, Yan C, Sun Q, Komarneni S. 2019. TiO₂/Sepiolite nanocomposites doped with rare earth ions: Preparation, characterization and visible light photocatalytic activity. *Micro Meso Mater*, 274: 25-32



Distinctive features of species of *Spicara* genus in Sevastopol coastal area

Natalya Kuzminova^{1,2*} , Ksenya Martemyanova²

¹A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, department of marine sanitary hydrobiology, Sevastopol, Russian Federation

²Environmentally-Educational Student Centre, Sevastopol, Russian Federation

*Corresponding author : kunast@rambler.ru
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-5453-0136>

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

Abstract: Based on the results of long-term observations of the species composition of the ichthyofauna in the coastal waters near the city of Sevastopol (Black Sea), we noted the occurrence of Mediterranean species *Spicara maena* from 2010, mainly in the Balaklavskaya bay. The frequency of blotched picarel, *Spicara maena* L. 1758 in catches of Sevastopol fishermen made it possible to carry out a detailed analysis of two species of the *Spicara* genus to identify differences in values of morphophysiological and morphometric parameters for *Spicara flexuosa* and *Spicara maena* in the period 2016 – 2018. The findings can be regarded as sound evidence of the existence of two species of the genus *Spicara* - *S. flexuosa* and *S. maena* - in Sevastopol coastal waters since such characteristics as the maximum body height and body height at the end of gill cover, the length of the segment between lower jaw apex and starting point of the base of the first pectoral and first dorsal fins, the length of the anal and dorsal fins, the number of rays in the dorsal fin differ significantly for these two species. The ratio of the height of fish head to its length, which is one of diagnostic signs used to differentiate species, also differs significantly for *S. flexuosa* and *S. maena*. In addition, during periods of rest, hepatosomatic and gonadosomatic indexes for the high body pickerel are noticeably higher than those for the blotched picarel.

Keywords: *Spicara flexuosa*, *Spicara maena*, Black Sea, Sevastopol

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Invasive alien species are animals or plants that have been introduced naturally or as a result of artificial acclimatization to new environments, outside their previous habitats. A suitable food source base for their thriving in Black Sea coastal waters together with another factor – global warming – leads to “mediterrization”, including a new formation of ichthyofauna.

Centracanthidae fish are an essential Black Sea bioresource as they are an important link of the trophic chain. They have a wide feeding habits spectrum (from zooplankton organisms to benthic animal forms), in addition to being themselves a food source for large species of carnivorous fish and currently one of the main parts of dolphin diet (Krivokhizhin and Birkun, 2009; Gladilina and Goldin, 2014).

There are three species of the *Spicara* genus in the Black Sea, among which *S. flexuosa* (Rafinesque, 1810) is the most widespread in the waters along all the coasts of the sea.

(Svetovidov, 1964; Salekhova, 1979; Vasilieva and Salekhova, 1983; www.fish.base). According to S. Stoyanov (cit. according to Svetovidov, 1964), Mediterranean blotched picarel and the picarel *Spicara alcedo* (Risso, 1810) were earlier found in single specimens only near Bulgaria. However, already in 2012, Ph.D. Boltachev A.R. indicated that two species of the genus *Spicara* — the high body pickerel and blotched picarel live near Crimea, the latter is reported to be periodically seen in fishermen catches along the southern coast of Crimea from Balaklavskaya bay to Ayudag (Boltachev and Karpova, 2012).

According to some fishermen reports and my observations, the blotched picarel has been seen regularly in catches in the area of the Balaklavskaya bay and Vasileva Balka since about 2010, mainly in summer and periods when water temperature drops due to wind-driven effects, upwelling. At the present time, *S. maena* is found in the samples from other Sevastopol bays all the year round, and in the Balaklavskaya bay this species practically has displaced the *S. flexuosa*.

Based on observations and analysis of these two species in 2018, it can be said some representatives of the high body pickarel and the blotched picarel are not clearly distinguishable from each other, which suggests that the *S. maena* not only confidently acclimatized in the entire marine area of Sevastopol, but, possibly, hybridized with the *S. flexuosa*. According to Salekhova L.P. (1979), hybridization of these two species took place in the Mediterranean basin. This study aims to confirm the existence of two species *S. flexuosa* and *S. maena* in the coastal waters of Sevastopol at present on the basis of comparative complex analysis of morphophysiological and morphometric of fish as well as to identify key biological parameters that can characterize these two species accurately.

2. Materials and Methods

The biological analysis of characteristics of the typical specimens of *S. flexuosa* Rafinesque, 1810 and *S. maena* L. 1758 (Pisces, Centranchidae) was carried out on fish caught in the bays of Sevastopol (Karantinnaya, Aleksandrovskaya, Balaklavskaya, Strelezkaya) using bottom snares in the period 2016-2018. Initially, the basis we used to distinguish the blotched picarel from high body pickarel was the sign that the length of head is less than body height (Tortonese, 1975, 1986; Fisher et al., 1987).

Next, biological analysis was carried out in accordance with approved techniques (Pravdin, 1966; Schwartz et al. 1968). Their age was determined by reading the scale. Three morphophysiological indices of these species – gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI), condition factor (CF) – were calculated in accordance with approved methods (Schwartz et al., 1968) for fish caught in cold spells of the year (gonads were on II maturity stages).

Morphometric analysis of plastic and meristic characteristics were made. The plastic parameters of fish included such measurements (in mm):

- the distance from the top of the lower jaw to the starting point of the base of the first pectoral fin (aB);
- the distance between the lower jaw apex and the vertical of the starting point of the base of the first dorsal fin (aD);
- the distance between the lower jaw apex and the vertical of the starting point of the bases of the ventral fins (aV);
- the distance from the top of the lower jaw to the vertical of the beginning of the base of the first anal fin (aA);
- the maximum body height (on the vertical of the base of the first ray of the dorsal fin) (H);
- body height at the end of gill cover (head height) (h);
- the length of the head (from the lower jaw apex to the most protruding back point of gill cover) (c);
- horizontal eye diameter (0);

- pectoral fin length (B);
- ventral fin length (V);
- dorsal fin length (D);
- anal fin length (A);
- the distance between eyes (f).

Among meristic indices we determined were: the number of rays in the dorsal (n_1), anal (n_2) fins and the number of vertebrae in two species (n_3).

All research results were statistically processed according to G.F. Lakin (1973); the parameters studied were calculated using the standard program «EXCEL» and presented as $M \pm SEM$.

3. Results and Discussion

As we earlier reported (Kuzminova et al., 2016a), the *S. flexuosa* can be seen almost constantly in Sevastopol territorial waters. There is quite a logical explanation for the fact that *S. maena* is confidently establishing itself in the waters all of Sevastopol coast. Firstly, the southernmost point of the Crimean peninsula (cape Sarych) is located near the Anatolian peninsula, where seasonal surface meridional current arises, that directed from the Turkish coast to the Crimea. Near Foros it bends west, then flows along the peninsula southwestern coast (Hydrometeorology..., 1991). It is with this current that Mediterranean species may get into our waters (Boltachev and Karpova, 2012).

Ph.D. Boltachev A.R. noted that earlier (data given before 2011), the blotched picarel was seen in the Balaklavskaya bay and on the open sea from cape Aya to cape Tolstyak; not a single fact of catching them in the Sevastopolskaya, Karantinnaya, Streletskaaya, Kruglyaya and Kazachaya bays was reported (Boltachev and Karpova, 2012).

We point out that the blotched picarel has been found in catches since 2017, not only in the Balaklavskaya bay, but also in Karantinnaya, Aleksandrovskaya ones and near cape Tolstyak. In the period 2016 – 2018, we analysed the Spicara specimen caught mainly in the following bays: Alexandrovskaya (147 specimens), Matyushenko (128 specimens), Karantinnaya (61 specimens); we could only analyze 14 and 4 specimens of fish from the Streletskaaya bay and cape Tolstyak area respectively.

The idea of a genetical similarity between these two species has been already supported by a number of experts (Tortonese, 1975; Arculeo et al., 1996; Turan, 2011; Imsiridou A. et al., 2011; Bektas et al., 2018; Parrinello et al., 1999). However, some researchers continue discovering additional signs (areas of distribution, color and fluorescence of the body and fins, but most importantly - morphometric differences) characterizing *S. flexuosa* and *S. maena*

(Tortonese, 1986; Karidas et al. 2009; Minos et al., 2013), that suggests that the problem of their identification still exists.

As can be seen from Table 1, the hepatosomatic index for both females and males of the Black Sea *S. flexuosa* is higher than that for the blotched picarel. The difference between the values of GSI for the two species is less, even though this index is usually higher for the high body pickerel. In addition, for both species spawning season began in early April, with the process of maturation to have begun, apparently, in March. No significant differences in condition factor were found for *S. flexuosa* and *S. maena*.

Interestingly, the same differences in the HSI values between the two species were found earlier for fish caught in the Mediterranean Sea (area of the island of Lampedusa): despite insignificant differences between representatives of the genus *Spicara*, this index was higher in females and males of *S. flexuosa*, compared to those of the *S. maena* (Lipskaya and Salekhova, 1980). The most likely explanation for this (and that is in agreement with our data) is that *S. flexuosa* has a wider feeding habits spectrum

compared to other representatives of the genus (Lipskaya and Salekhova, 1980).

The study revealed there were no significant differences in parameters of the number of rays in the anal fin and the number of vertebrae (Table 2).

In males, significant differences between the two species were found in the following parameters: the distance between the lower jaw apex and starting point of the base of the first pectoral fin (aB), the distance between the lower jaw apex and the vertical of the starting point of the base of the first dorsal fin (aD); the length of the dorsal and anal fins (Table 3). Moreover, the Mediterranean invader has one ray more (Table 4). The study revealed that in females and males of the blotched picarel the distance between the snout and starting point of ventral fin is greater than that for the *S. flexuosa*, but these differences are insignificant. *S. maena* has a much higher body height than *S. flexuosa* but the head height, on the contrary, is less ($p \leq 0.05$). The eye diameter for high body pickerel is greater than that for the blotched picarel, which is confirmed by data in the earlier studies of Mediterranean species (Salekhova, 1979), but these differences are significant only in males.

Table 1 Morphophysiological parameters of individuals of the genus *Spicara* in the coastal area of the Sevastopol in 2016-2018

parameters	age, y.o.	high body pickerel		blotched picarel	
		female	male	female	male
HSI, ‰	0+	10,89±0,95	–	7,69±1,76	–
	1+	10,81±0,41	–	8,44±0,71	–
	2+	12,69±1,35	–	8,23±0,31	–
	3+	16,04±2,61	17,81±3,36	10,25±2,59	12,76±0,57
	4+	–	13,09±1,16	–	11,75±2,45
GSI, %	0+	1,09±0,17	–	0,44±0,13	–
	1+	0,92±0,04	–	0,98±0,08	–
	2+	1,11±0,14	–	0,68±0,11	–
	3+	1,01±0,16	0,46±0,13	0,71±0,05	0,16±0,009
	4+	–	0,24±0,04	–	0,24±0,02
CF, %	0+	1,55±0,09	–	1,58±0,03	–
	1+	1,66±0,02	–	1,67±0,05	–
	2+	1,57±0,03	–	1,65±0,04	–
	3+	1,87±0,14	1,79±0,06	1,88±0,27	1,64±0,02
	4+	–	1,78±0,09	–	1,76±0,08

Note: values in bold mean significant differences between two species of the same sex and age

Table 2 Meristic characteristics of high body pickerel and blotched picarel in the coastal area of Sevastopol

species	high body pickerel	blotched picarel
index		
the number of rays in the dorsal fin, n ₁	21,35 ± 0,09	22,3 ± 0,08
the number of rays in the anal fin, n ₂	12,23 ± 0,06	12,44 ± 0,1
number of vertebrae, n ₃	23,32 ± 0,09	23,05 ± 0,09

Note: values in bold mean significant differences between two species

In the earlier study, George Minos and co-authors evaluated the information content of some plastic characteristics and calculation indices of *Spicara*, and come to the conclusion that many of them depend not only on species, but also on the stage of fish maturation. The key characteristics used to distinguish *S. maena* from *S. flexuosa* were the ratio of head length (s) to standard length (Sl), head height (h) to Sl and h/c (Minos et al., 2013). Our study revealed that the height of the head and the ratio of height to length of the head for both species differ significantly ($p \leq 0.05$), which confirms the presence of two species of the genus *Spicara* in Sevastopol coastal waters.

There is some evidence that the presence of teeth on the vomer and the number of canines on the dentale are also used as diagnostic signs for *Spicara* genus. Teeth on the vomer of *S. flexuosa* (if any) are in a small area at the front of the head, there are at least two pairs of canines on the dentale. The teeth on the vomer of *S. maena* are arranged in a long row along the midline of the bone, continuing on the handle, and the dentale has no more than one pair of canines (Vasilieva and Salekhova, 1983). In addition, based on both the exterior of fish and osteological analysis of the skull, some authors say about a high skull of *S. maena* compared to *S. flexuosa* (Vasilieva and Salekhova, 1983).

When comparing analytically the high body pickerel and the supposed blotched picarel, we discovered no teeth on the vomer in any individuals of the two species (from Balaklavskaya bay and other catching locations). However, significant differences found between the values of morphophysiological indices and eight morphometric characteristics suggest the existence of two species.

We have supplemented our research with mathematical treatment of some plastic characteristics of all of the specimens of fish (the data base) and calculated the mode in a discrete sequence of those characteristics.

As can be seen in Figure 1, the distribution of such parameters as the height of head, the height of body, the length of the dorsal fin (converted to the standard length) is very close to two-modal one.

As can be seen in Figure 1, the distribution of such parameters as the height of head, the height of body, the length of the dorsal fin (converted to the standard length) is very close to two-modal one.

Table 3 Plastic characteristics of high body pickerel and blotched picarel in the coastal area of Sevastopol (in % of SL)

index	species		blotched picarel	
	high body pickerel			
	female	male	female	male
aB	28,56±0,14	28,85±0,17	–	28±0,16
aD	30,47±0,32	30,16±0,23	30,83±0,63	29,1±0,24
aV	33,09±0,19	33,60±0,20	38,91±3,07	33,9±0,53
aA	59,99±0,37	60,55±0,25	58,64±0,68	60,56±0,29
H	19,72±0,36	19,47±0,49	24,66±0,63	27,18±0,64
h	22,47±0,29	23,42±0,40	19,37±0,37	21,7±0,18
c	26,97±0,13	26,70±0,12	27,09±0,45	26,63±0,13
0	10,89±0,30	9,87±0,13	10,39±0,26	9,39±0,1
f	7,56±0,11	7,55±0,27	7,54±0,25	8,06±0,14
B	22,51±0,31	23,38±0,55	22,83±0,82	24,22±0,35
D	51,21±0,26	51,41±0,37	50,37±0,87	52,62±0,32
V	21,49±0,32	21,65±0,53	21,52±0,56	22,76±0,22
A	21,16±0,31	20,09±0,53	20,88±0,43	21,46±0,13
h/c	0,84±0,01	0,88±0,02	0,71±0,01	0,82±0,01

Note: values in bold mean significant differences between two species of the same sex

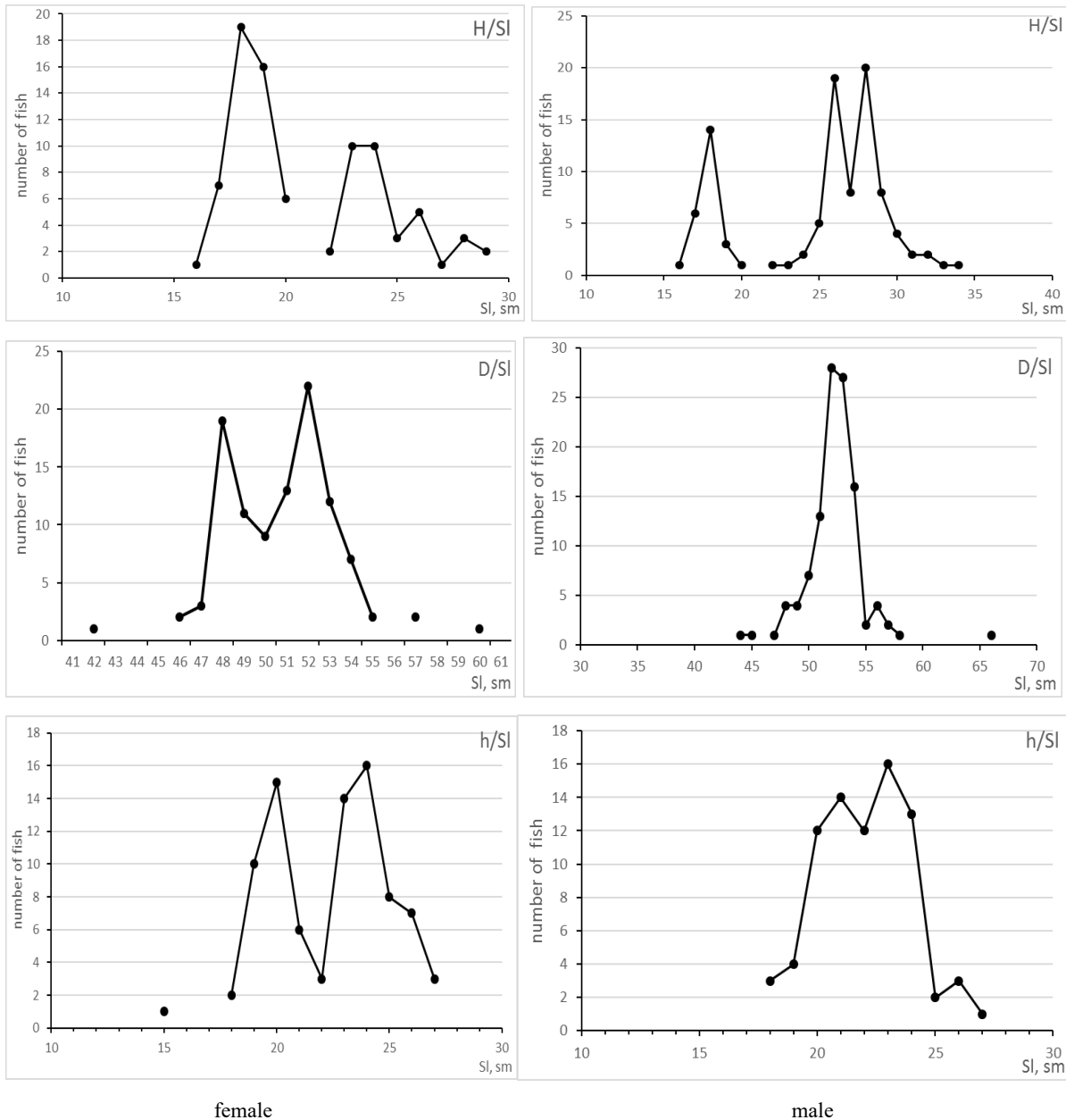


Fig. 1. Distribution of some plastic characteristics of Spicara genus in the coastal area of Sevastopol in 2016 - 2018: H - body height, h - head height, D - dorsal fin length, Sl - standard length

The fact that the values of head length of both species in our bays differ insignificantly, and the lack of teeth on the vomer in the *S. maena* jaw suggest that the blotched picarel and the *S. flexuosa* may have been hybridizing freely in our waters, which was described in the earlier studies of these species living in the Mediterranean Sea (Salekhova, 1979). In addition, it is known that the relative values of some plastic characteristics (as well as morphophysiological indicators) for the *S. flexuosa* caught in the Balaklavskaya bay, South coast, Karadag, Batumi, Novorossiysk differed from those for the fish caught near Sevastopol, which suggest that biological parameters of this bottom-pelagic species are dependent on habitat factors. That link is confirmed by data from other authors (Minos et al., 2013): in North Aegean Sea the height of the body of the *S. flexuosa* is higher than that of Black Sea individuals from Sevastopol waters. It is also

known, that Black Sea population of Centranchidae in Crimean waters differs from the Mediterranean one in having higher body length variability, higher body weight variability, high condition factor and a high hepatosomatic index (Lipskaya and Salekhova, 1980). Consequently, originating from the Mediterranean Sea and now inhabiting mainly the Balaklavskaya bay, which is far from other Sevastopol bays, the *S. maena* may have experienced changes in its growth rate. Hence changes in plastic parameters of the fish. Moreover, the blotched picarel and the native *S. flexuosa* may have been hybridizing with each other for years, which has led to blurry biological characteristics of these two different species and, among other things, affected the structure of the graphs obtained – in some cases we can see three rather than two peaks of the

feature frequency (Fig. 1), which can serve as evidence of the existence of hybrids in the schools of picarels.

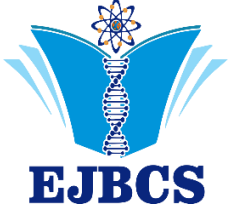
4. Conclusion Thus, the study convincingly demonstrates the existence of two species of the genus *Spicara* – *Spicara flexuosa* and *Spicara maena* – since such characteristics as the maximum body height and body height at the end of gill cover, the length of the segment between lower jaw apex and starting point of the base of the first pectoral and first dorsal fins, the length of the anal and dorsal fins, the number of the rays in the dorsal fin differ significantly for the two species. Also, for *Spicara flexuosa* and *Spicara maena*, there is a clear difference between the values of the ratio of height of the fish head to its length, another diagnostic sign used to differentiate species. During periods of rest, hepatosomatic index and gonadosomatic index for Black Sea *S. flexuosa* are noticeably higher than those for *S. maena*.

Acknowledgments. The authors would like to thank Vasilyeva E.D., Dr. Biol. Sci., Scientist of the Research Museum of M.V. Lomonosov Moscow State University, as well as Ph.D. Salekhova L.P., for valuable consultations while my working on the article, O. A. Akimova, Head of the Research and Information Department of the IBSS for invaluable help in gaining access to numerous scientific papers on the subject, the fishermen of the IBSS and the fishing team Kolkhoz imeni Lenina from Balaklavskaya bay for fish provided as research material.


This work was carried out on the state theme of the IBSS “Molismological and biogeochemical basis of the homeostasis of marine ecosystems” (№ 0828-2019-0006, registration number AAAA-A18-118020890090-2)

References

- Arculeo M, Mauro A, Scelsa G, Brutto S, Cammarata M, Parrinello N, 1996. Protein differences among the Mediterranean species of the genus *Spicara*. *J of Fish Biology* 49(6): 1317-1372.
- Bektas Y, Aksu I, Kalayci G, Irmak E, Engin S, Turan D, 2018. Genetic differentiation of three *Spicara* (Pisces: Centranchthidae) species, *S. maena*, *S. flexuosa* and *S. smarvis*: and intraspecific Substructure of *S. flexuosa* in Turkish coastal waters. *Turk J of Fish and Aquat Sciences* 18: 301-311.
- Boltachev AR, Karpova EP, 2012. Ichthyofauna of the coastal zone of Sevastopol (Black Sea). *Mar Ecol J* 11(2): 10-27. (in Russian).
- Fischer W, Bauchot M-L, Schneide M, 1987. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Médit et mer Noire. Zone de pêche 37. Vertébrés, FAO, Rome. II.: 1031-1036.
- Gladilina EV, Goldin PE, 2014. New food objects in the nutrition of the Black Sea common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* (Mammalia, Cetacea). *Vest of Zoology* 48: 83-92. (in Russian).
- Hydrometeorology and hydrochemistry of the seas of the USSR. 1991. Reference edition. Project "Seas of the USSR". In: Terziev FS (ed). 4. The Black Sea. №1. Hydrometeor conditions, Gidrometizdat, Saint-Petersburg, 430 p. (in Russian).
- Imsiridou A, Minos G, Gakopoulou A, Katsares V, Karidas T, Katselis G, 2011. Discrimination of two picarel species *Spicara flexuosa* and *Spicara maena* (Pisces: Centranchthidae) based on mitochondrial DNA sequences. *J of Fish Biology* 78:373-377. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02858.x, available online at wileyonlinelibrary.com
- Karidas Th, Argiridis N, Minos G, 2009. Sex identification on hermaphrodite picarel *Spicara flexuosa* (Rafinesque, 1810) based on external characteristics and length frequency analysis. In: Abstracts of the 31st Scien conf of Hellenic Association for Biol Sciences, Patra, 14-16 May 2009. (In Greek and English).
- Krivokhizhin SV, Birkun AA 2009. The food spectrum of cetaceans in the Black Sea. *Mar Ecol J* 8(4): 67-78. (in Russian).
- Kuzminova NS, Salekhova LP, Oven LS, Chesnokova II, 2016. Biodiversity of ichthyofauna in the coastal waters of Sevastopol. In: Rudneva I. (ed.) Ecotoxicological studies of the coastal Black Sea ichthyofauna in the region of Sevastopol, GEOS, Moscow (in Russian).
- Lakin GF, 1973. Biometrics. Higher School, Moscow (in Russian).
- Lipskaya NYa., Salekhova LP, 1980. The study of nutrition and morphophysiological indicators of fish of the genus *Spicara*. *Ecology of the sea*. 2: 66-81. (in Russian).
- Minos G, Imsiridou A, Katselis G, 2013. Use of morphological differences for the identification of two picarel species *Spicara flexuosa* and *Spicara maena* (Pisces: Centranchthidae). *Medit Mar Science*. 14(3): 26-31. doi:http://dx.doi.org/10.12681/mms.423
- Parrinello N, Brutto SLo, Picciurro A, Arculeo M, Rinaldi AM, 1999. Taxonomic study of the family Centranchthidae (Pisces) by RFLP analysis. *Biol Mar Medit* 6 (1): 719-721.
- Pravdin IF, 1966. Guide to the study of fish. Food. prom., Moscow (in Russian).
- Salekhova LP, 1979. Sparidae fish of the seas of the Mediterranean basin. *Nauk Dumka, Kiev* (in Russian).
- Schwartz SS, Smirnov VS, Dobrinsky LN, 1968. Method of morphophysiological indicators in the ecology of terrestrial vertebrates. *Trudi Instituta Ecologii Rasteniy i Ghivotnih*. Iss. 58, 386 p. (in Russian).
- Svetovidov AN, 1964. Fishes of the Black Sea. *Nauka, Moscow* (in Russian).
- Tortonese E. Fauna d'Italia “Osteichthyes”. *Pesci Ossei*. 1975. Edizioni Calderini Bologna XI:124-131.
- Tortonese E, 1986. Centranchthidae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E (eds.) *Fish of the North-eastern Atlantic and Mediterranean*. 2. UNESCO, Paris: pp. 908-911.
- Turan C, 2011. The systematic status of the Mediterranean *Spicara* species (Centranchthidae) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequence and morphological data. *J Black Sea/Medit Environment* 17(1): 14-31.
- Vasilieva E.D., Salekhova L.P, 1983. Clarification of the diagnoses of a species of the genus based on the study of osteological characteristics. *Zoolog J* 52(7): 1044-1056. (in Russian). <https://www.fishbase>.



Alüminyum oksitin *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarında total hemosit sayıları üzerine etkileri

Ayşe Kara¹ , Benay Tunçsoy² , Pınar Özalp^{1*} 

¹Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

²Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana, Türkiye

^{1*}Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

*Corresponding author : pozalp@cu.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-2977-6334>

Received : 04/11/2020
Accepted : 25/12/2020

Özet: Ağır metaller, çevre kirliliğinin önemli etkenlerinden biridir. Ağır metal kirliliği sadece hayvanlarda büyüme, üreme, hayatta kalma ve metabolizma ile değil aynı zamanda doğuştan gelen bağışıklık sisteminde de zararlı etkilere neden olabilir. Yapılan çalışmada, *Galleria mellonella* son evre larvalarının birinci arka bacaklarına Al₂O₃ çözeltisinin farklı derişimleri (10, 50 ve 100 µg/mL) Hamilton enjektörü yardımıyla enjekte edilerek 2, 4 ve 8 saatlik sürelerle maruz bırakılmıştır. Uygulama sonunda kontrol ve deneme gruplarından alınan hemolenf örnekleri ile total hemosit sayısı belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, Al₂O₃ çözeltisine maruz bırakılan *G. mellonella* larvalarının maruz bırakılan etki sürelerinde total hemosit sayısında kontrole göre tüm konsantrasyonlarda azalma meydana gelmiş ve bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. *G. mellonella* larvalarının total hemosit sayılarında meydana gelen bu değişimler, çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmede iyi bir model organizma olarak kullanılabilirliğini ve başka türler üzerinde de yapılacak immünolojik ve fizyolojik çalışmalara yol gösterebileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, Alüminyum oksit, Total Hemosit Sayısı

Effects of Aluminum Oxide on Total Hemocyte Counts of Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae

Abstract: The heavy metals are one of the important factors of environmental pollution. Heavy metal pollution can cause adverse effect not only on growth, reproduction, survival, and metabolism in animals, but also effects the innate immune system adversely. Different concentrations of Al₂O₃ solution (10, 50 and 100 µg/mL) were injected into the proleg of the last instar *Galleria mellonella* larvae by Hamilton injector for 2, 4 and 8 hours. Then, the total hemocyte count was determined with the hemolymph obtained from the control and experimental groups. As a result of the data obtained, *G. mellonella* larvae exposed to Al₂O₃ solution showed a decrease in total hemocyte count in 2, 4 and 8 hours in all concentrations compared to the control and this reduction was found to be statistically significant. Changes in hemocyte numbers of *G. mellonella* larvae have shown that it can be used as a good model organism in evaluating environmental pollution levels and it can also lead to immunological and physiological studies on other species.

Keywords: *Galleria mellonella*, Aluminum Oxide, Total Hemocyte Count

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Kentleşme ve sanayi endüstrilerinin büyük bir hızla gelişmesi sonucu ortaya çıkan metal kirliliği çevre problemlerinden biridir. Metallerin, çevreye yayılmasının esas nedenleri doğal (volkan, erozyon) ve antropojenik faaliyetlerin (tarımsal, endüstriyel süreçler) bir sonucudur (Florea ve ark. 2004; Florea 2005; Büsselberg ve Florea 2006). Kurşun (Pb), civa (Hg), kadmiyum (Cd), krom (Cr), arsenik (As), talyum (Tl), alüminyum (Al) gibi nispeten

yüksek yoğunlukta ve düşük miktarda pek çok toksik metal bulunmaktadır (Symon ve Hutton 1986; Hawkes 1997; Suganya ve ark. 2016; Sadhu ve ark. 2018). Alüminyum ise yer kabuğunun yaklaşık % 8' ini oluşturan önemli bir metaldir (Barabasız ve ark. 2002). Bu metale maruz kalan organizmaların kan, sinir, solunum, iskelet ve bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere farklı biyolojik sistemlerinde toksisiteye neden olmaktadır (Willhite ve ark. 2014). Ayrıca alüminyum toksisitesi, farklı mekanizmalarla gösterilen

kan-beyin bariyer geçirgenliğinin artırılması, fosforilasyon-defosforilasyon süreçlerine müdahale edilmesi ve daha sonra serbest radikallerin üretimi ve ikincil haberci sisteminin bozulmasıyla birlikte değişen iyon metabolizmasını içermektedir (Agarwal ve ark. 1996; El-Demerdash ve ark. 2020). Alüminyumun organizmaya etkisi uygulanan derişim ve etki süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Onur 1997). Alüminyum doğada saf halde bulunmayan, organizmaya verildiğinde emilimi ve dağılımı iyi olan bir bileşendir. Günümüzde ise daha çok alüminyum tuzları olan Alüminyum hidrür (AlH_3), Alüminyum klorür ($AlCl_3$), Alüminyum oksit (Al_2O_3), Alüminyum sülfat (Al_2SO_4)₃ olarak kullanılmaktadır (Alkan ve ark. 2006). Alüminyum oksit, Al_2O_3 kimyasal formülüne sahip bir alüminyum ve oksijen bileşiginden oluşmaktadır (Pehlivan 2018). Al_2O_3 ; katalizör, yalıtım, yüzey koruyucu kaplama ve alaşım, ulaşım, kimya ve gıda sanayisi gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir (Piriyawong ve ark. 2012). Bu metaller organizmaya su, hava ve besin yoluyla alınmaktadır. Ancak fazla miktarda alınan metal bileşikler, organizmada birikerek bir tehlike oluşturduğu için ekosistemi bozmakta ve bazı organizmaların hayatı üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır (Gupta 2013; Suganya ve ark. 2016). Metallerin ekosistemdeki toksisitesini, biyolojik birikimini ve biyotransferini incelemek ve çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmek için böcekler biyoindikatör olarak kullanılan iyi bir model organizma olarak kabul edilmiştir (Banville ve ark. 2012; Wu ve Yi 2015).

Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* larvalarının ticari yönden üretime uygun olması, oda sıcaklığında üretiminin kolay ve kısa sürede yapılmasından dolayı son yıllarda model organizma olarak immünolojik, morfolojik ve fizyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Farklı tür organizmalarda alüminyum oksitin organizmaya alındığında hemosit sayıları üzerine toksik etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Sunulan çalışmada, *G.mellonella* larvalarına Al_2O_3 çözeltisinin farklı konsantrasyonları (10, 50 ve 100 $\mu g/mL$) enjekte edilip 2, 4 ve 8 saatlik sürelerin sonunda total hemosit sayıları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metod

2.1. Larvaların elde edilmesi

G. mellonella, $28 \pm 2^\circ C$ sıcaklık ve $\%70 \pm 5$ bağıl neme sahip laboratuvar koşullarında Bronksil (1961) tarafından belirlenen yarı sentetik besin kültüründe yetiştirilen larvalardan elde edilmiştir. Stok kültürün devamlılığı besin kavanozu içerisine konulan ergin böceklerin çiftleşerek besin üzerine yumurta bırakmaları ile sağlanmıştır. Deneylerde bu yumurtalardan çıkan larvalar kullanılmıştır.

2.2. Al_2O_3 Çözeltisinin Hazırlanması ve Larvalara Uygulanması

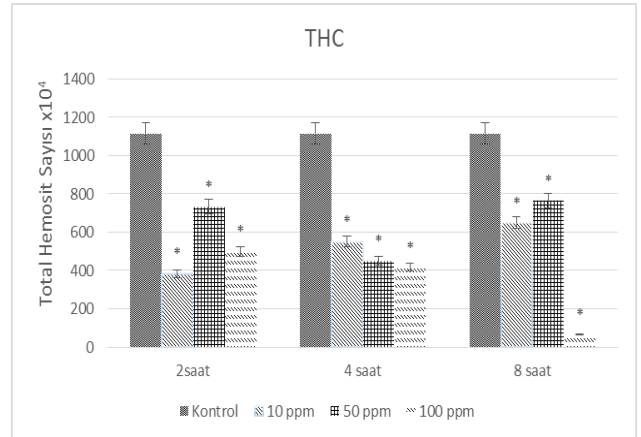
Al_2O_3 çözeltisinin derişimi 1000 mg/L olacak şekilde ultra saf su içerisinde çözülmüştür. *G. mellonella* son evre larvalarının birinci arka bacaklarına Al_2O_3 çözeltisinin 10, 50 ve 100 $\mu g/mL$ derişimleri Hamilton enjektörü yardımıyla uygulanmıştır. Kontrol grubunda ise saf su

enjekte edilmiştir. Uygulamadan 2, 4 ve 8 saatlik süreler sonunda larvalardan alınan hemolenf ile total hemosit sayıları incelenmiştir.

2.3. *G. mellonella* Larvalarının Total Hemosit Sayılarının Belirlenmesi

Hemolenf örnekleri alınmadan önce larvalar $-20^\circ C$ 'de 15-20 saniye bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlanmıştır. Larvalar $\%95$ 'lik etanol ile silindikten sonra, birinci arka bacak üstünden ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip mikrokapiler tüp (SIGMA) yardımıyla 10 μL hemolenf alınarak içerisinde N-phenylthiourea (Sigma Aldrich) (PTU) bulunan ependorf tüplere aktarılmıştır. Alınan hemolenf örneğinden 4 μL alınarak, buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 μL antikoagulant (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na_2EDTA ve 0,041 M Sitrik asit, pH = 4,5) bulunan ependorf tüplerine aktarılmıştır. 1:10 oranında seyreltme yapılan hücre süspansiyonundan 10 μL alınarak Neubauer hemositometresine yüklenmiştir. Hemositler, Leica DM750 marka mikroskopta sayılarak, bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı belirlenmiştir. Sayılan hemositler, Jones (1962) methodu kullanılarak hesaplanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma



Şekil 1. *G. mellonella* larvalarının hemolenfindeki total hemosit sayısı. SNK testi; “*” her uygulama grubu için istatistiksel farklılıkları belirtmek için kullanılmıştır (p<0.05).

Çevre kirleticisi olarak bilinen metal ve metal bileşikler atmosfer, hidrosfer, litosfer ve biyosfer arasında hareket eden tüm ekosistemlerin doğal bileşenleridir (Bargagli 2000; Büsselberg ve Florea 2006). Metal kirliliğinin başlıca kaynağı olan volkanik patlamalar, madencilik ve sanayi endüstrileri, hidroelektrik santralleri, fosil yakıtlarının yanması ve tarım sisteminin (Pandey ve ark. 2016) oluşturduğu toksik etkiler, organizmalarda birikerek canlılar için tehlike oluşturmaktadır. Böceklerin bağışıklık sisteminde hemositler savunma mekanizmasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Wu ve ark. 2016) ve bazı organizmalarda hemosit yoğunluğu, omurgasızların doğuştan gelen immünolojik etkisinin değerlendirilmesi için bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Kacsoh ve Schlenke 2012). Yapılan çalışmada, deney süresi sonunda

tüm uygulama gruplarında mortalite gözlenmemiştir. Total hemosit sayısında 2 saatlik sürede kontrole oranla 10, 50 ve 100 µg/mL uygulanan gruplarda sırasıyla % 65, % 34 ve % 55 oranında, 4 saatlik sürede kontrole göre % 50, % 59 ve % 62 oranında, 8 saatlik etki süresinde ise % 41, % 31 ve % 94 oranında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Meydana gelen bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 1). Çevresel koşullardaki değişikliklerden etkilenen total hemosit sayısı patojenler, parazitler ve ksenobiyotiklerinde (insektisit, ağır metal) dahil olduğu farklı tipteki stres faktörlerinden de etkilenerek değişiklik göstermektedirler (Bergin ve ark. 2003; Wu ve Yi 2015). Yapılan bir çalışmada, *G. mellonella*'nın ikinci evre larvalarına farklı derişimlerde (100, 500, 1000, 3000 ve 5000 µg/mL) ZnO NP'leri eklenmiş ve larvaların hemosit sayıları belirlenmiştir. ZnO NP'lerinin farklı derişimlerine maruz kalan grupların hemosit sayısının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Eskin ve ark. 2019). Metal toksisitesi ve beraberinde getirdiği olumsuzluklar ağır metal tipine, uygulanan hayvan türüne, maruz bırakılan doza ve hayvanın yaşamsal evresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Yılmaz 2013). *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarının besinine farklı dozlarda kadmiyum ve bakır ilave edildiğinde 12.5 mg/kg Cd konsantrasyonunda total hemosit sayısı azalırken, 50 mg/kg Cd ve Cu konsantrasyonunda önemli bir şekilde artmıştır. Böceklerin bulunduğu ortamdaki stres faktörleri altında total hemosit sayılarındaki görülen azalmanın nedeni, kan hücrelerinin dolaşımdan dokulara geçmiş olabileceğini düşündürmektedir (Sendi ve ark. 2018). Ayrıca alüminyumun da çözünebilir formu birçok metal gibi hedef organlarda daha iyi emildiği ve dağıldığı için böceklerin bağışıklık sistemine hızlı bir şekilde etki edebilir (Pastacı ve ark. 2010). Yapılan başka bir çalışmada ise *G. mellonella* besinine farklı dozlarda alüminyum klorür ($AlCl_3$) eklenmiş, böceğin larva ve pupa gelişim süresinin ve ergin ömür uzunluğunun kısaldığı ancak yaş ağırlıklarının, eşey oranlarının, morfolojisinin ve hemosit sayısının metalden etkilenmediği görülmüştür (Yılmaz 2013). Al_2O_3 çözeltisinin farklı konsantrasyon uygulamalarının, böcekler üzerinde gözlenen toksik etki mekanizmasının bilinmesi zararlı böceklerle mücadelede, hedef olmayan organizmalara ve çevreye daha az olumsuz etkisi olan yeni kimyasal metotların geliştirilmesine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

4. Sonuçlar

Yapılan çalışmada, *G. mellonella* larvalarında Al_2O_3 çözeltisinin farklı derişimlerinin 2, 4 ve 8 saatlik etki süresine maruz bırakılarak immünolojik etkilerinin belirlenmesiyle, larvanın hemolenfinde bulunan total hemosit sayılarındaki farklılıklar tespit edilmiştir. Denenen tüm uygulama gruplarındaki total hemosit sayılarındaki azalmanın hemositler ile oluşan fagositoz, enkapsülasyon ve nodülasyon gibi immün savunma yanıtlarının metale maruz kalan böceklerin hemolenfindeki toksite düzeyine bağlı olarak meydana gelmiş olabileceği ve organizmaya alınan Al_2O_3 ile metallerin, kan hücrelerindeki proteinlere bağlanarak hemositlerin fonksiyonlarını etkilemiş olabileceği

düşülmektedir. Ayrıca çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmede *G. mellonella*'nın bir biyoidikatör olarak kullanılacağı ve başka türler üzerinde yapılacak immünolojik, fizyolojik, morfolojik ve genotoksik çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

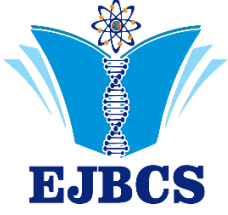
Teşekkür

Yapılan çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FBA- 2020- 12547). Aynı zamanda bu çalışma, Gaziantep'te gerçekleştirilen 2nd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2020) kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

- Agarwal SK, Ayyash L, Gourley CS, Levy J, Faber K, Hughes CL Jr. 1996. Evaluation of the developmental neuroendocrine and reproductive toxicology of aluminium. *Food Chem Toxicol.* 34, 49-53
- Alkan U, Teksoy A, Başkaya SH. 2006. Yüzeysel sulardaki doğal organik maddelerin gideriminde uygun koagülasyon şartlarının belirlenmesi. *Ekoloji.* 15(59), 18-26
- Banville N, Browne N, Kavanagh K. 2012. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence.* 3(6), 497-503
- Barabasz W, Albinska D, Jaskowska M, Lipiec J. 2002. Ecotoxicology of Aluminium. *Pol J Environ Stud* 11(3), 199-203
- Bargagli R. 2000. Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. *Rev Environ Contam T.* 166: 129, 173
- Bergin D, Brennan M. & Kavanagh K. 2003. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* 5, 1389-1395
- Bronksil JF. 1961. A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *J Lepidopteran Soc.* 102-104
- Büsselberg D. and Florea AM. 2006. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals.* 19: 419-427
- El-Demerdash FM, Baghdadi HH, Ghanem NF, Al Mhanna AB. 2020. Nephroprotective role of bromelain against oxidative injury induced by aluminium in rats. *Environ Toxicol Phar.* 80, 103509
- Eskin A, Öztürk Ş, and Körükçü M. 2019. Determination of the acute toxic effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in total hemocytes counts of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) with two different methods. *Ecotoxicology.* 28:801-808
- Florea AM, Dopp E, Obe G, Rettenmeier AW. 2004. Genotoxicity of organometallic species. In: Hirner AV, Emons H, eds. *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment: Analysis, Distribution, Processes and Toxicological Evaluation.* Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 205-219
- Florea AM. 2005. Toxicity of Alkylated Derivatives of Arsenic, Antimony and Tin: Cellular Uptake, Cytotoxicity, Genotoxic Effects, Perturbation of Ca^{2+} Homeostasis and Cell Death. Aachen: Shaker Verlag
- Gupta V. 2013. Mammalian Feces as Bio-Indicator of Heavy Metal Contamination in Bikaner Zoological Garden, Rajasthan, India. *Res J Anim Vet Fish Sci.* 1(5), 10-15
- Hawkes JS. 1997. Heavy metals. *J Chem Educ.* 74 (11) : 1374

- Jones JC. 1962. Current Concepts Concerning Insect Hemocytes. *Am Zool.* 2:209-246
- Kacsóh BZ, Schlenke TA. 2012. High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. *Plos One.* doi.org/10.1371/journal.pone.0034721
- Onur E. 1997. Alüminyum Toksikitesinin Kalite Kontrol Açısından Değerlendirilmesi. *Turk Neph Dial Transpl.* 6, 164-170.
- Pandey R, Dwivedi MK, Singh PK, Patel B, Pandey S, Patel B, Patel A. & Singh B. 2016. Effluences of heavy metals, way of exposure and bio-toxic impacts: an update. *J Chem & Chem Sci.* 6(5), 458-475
- Pastacı N, Bahtiyar N, Karabük S, Gönül R, Or EM, Dursun Ş, Barutçu BÜ. 2010. Köpeklerde Alüminyum toksikasyonunun Alzheimer hastalığı üzerine Etkisi. *Tübav.* 3(3), 271-275
- Pehlivan M. 2018. Alüminyum oksit nanopartiküllerin ve demir bazlı manyetik alüminyum oksit nanokompozitlerin çözelti yakma metodu ile sentezi ve uygulamaları. İstanbul, Türkiye.
- Piriyawong V, Thongpool V, Asanithi P, Limsuwan P. 2012. Preparation and Characterization of Alumina Nanoparticles in Deionized Water Using Laser Ablation Technique. *J Nanomater.* 1-6
- Sadhu SD, Garg M, Kumar A. 2018. Major Environmental Issues and New Materials. *New Polymer Nanocomposites for Environmental Remediation.* s. 77- 97
- Sendi JJ, Baghban A, Zibae A. 2018. Effect of essential and non-essential elements on cellular immune system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *ISJ,* 15: 158-168
- Suganya M, Karthi S, and Shivakumar MS. 2016. Effect of Cd and Lead Exposure on Tissue Specific Antioxidant Response in *Spodoptera litura*. *Free Rad. Antiox.* Vol.6: 90-100
- Symon C, Hutton M. 1986. The quantities of cadmium, lead, mercury and arsenic entering the U.K. environment from human activities. *Sci Total Environ.* 57: 129-150
- Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yenugadhati N, Wisniewski TM, Arnold IM, Momoli F, Krewski D. 2014. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit Rev Toxicol.* 44, 1-80
- Wu G, Yi Y. 2015. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comp Biochem Phys C.* 167:131- 139
- Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi Y. 2016. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell.* 48, 297-304
- Yılmaz, E. 2013. Farklı dozlardaki Alüminyum Klorür'ün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Biyolojisine ve Hemositlerine etkisi. İstanbul, Türkiye.



Anter Kültürü Tekniği ile Dihaploid Nitelikli Üç Burun ve Dolma Tipli Biber Hatlarının Geliştirilmesi

Atiye Püren Ceyhan¹ , Hakan Aktaş^{1*} 

¹Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri, Isparta, Türkiye

*Corresponding author : hakanaktas@isparta.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0001-0001-8280-5758>

Received : 06/11/2020
Accepted : 06/12/2020

Özet: Çalışmada biberde anter kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmesinde genotip ve besin ortamlarında kullanılan antioksidanların etkisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu kapsamda üç burun ve dolma biberlere ait 4 farklı çeşitte (Üç burun, Buket, B22 ve B23) haploid bitki elde edilmesindeki başarı oranını artırmaya yönelik farklı miktarlardaki çinko, salisilik asit ve C vitaminin besin ortamlarında kullanılmasıyla, anterlerden filamentlerin ayrılmasıyla anter dokusunda oluşacak olan oksidatif stres algısını önleyerek üç burun ve dolma biber tiplerindeki androgenesise etkisi incelenmiştir. Denemede toplanan tomurcuklar 24 saat 4°C’de soğuk uygulamasına tabi tutulduktan sonra, anterler besin ortamı olarak Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamının 7 farklı kombinasyonunda test edilmiştir. Çalışma sonuçları genotiplere göre değerlendirildiğinde Buket genotipi hariç embriyo oluşumu gözlenmiştir. Besin ortamına ilave edilen antioksidan (Çinko, SA ve Vit. C) bileşiklerinin embriyo oluşumu bakımından O6 (50 mg/L Vit. C) B23 ve Üç burun genotiplerinde en yüksek sonuçları vermiş ve bu ortamı O4 (6.4 mg/L Zn), O5 (25 mg/L Vit. C), O3 (1.4 mg/L Zn) besin ortamları izlemiştir.

Çalışmada sadece MS temel besin ortamında 4 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren kontrol ortamından elde edilen (Buket çeşidi hariç) embriyoların tamamı bitkiye dönüşmüştür. Ploidi seviyesine ilişkin bulgular değerlendirildiğinde, gelişen bitkilerin %43’ünün haploid kromozom yapısına sahip oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biber, anter kültürü, besin ortamı, antioksidant, haploid bitki

Development of Three Dihaploid Nose and Bell Pepper Lines with Anther Culture Technique

Abstract: In this study, it was aimed to reveal the effect of antioxidants used in genotype and nutrient media in obtaining haploid plants through anther culture in pepper. In this context, by using different amounts of zinc, salicylic acid and vitamin C in nutrient environments to increase the success rate in obtaining haploid plants in 4 different varieties of three nose and stuffed peppers (Three nose, Buket, B22 and B23), the oxidative By preventing the perception of stress, its effect on androgenesis in three nasal and bell pepper types was investigated. After the buds collected in the experiment were subjected to cold application at 4oC for 24 hours, the anthers were tested as a nutrient medium in 7 different combinations of Murashige and Skoog (1962) basic nutrient media. When the results of the study were evaluated according to the genotypes, embryo formation was observed except Buket genotype. The antioxidant (Zinc, SA and C vit.) Compounds added to the nutrient medium gave the highest results in terms of embryo formation in O6 (50 mg /L C vit.) B23 and Three nasal genotypes, and this medium was O4 (6.4 mg /L Zn), O5 (25 mg /L C vit.), O3 (1.4 mg / L Zn) nutrient media followed.

In the study, all of the embryos obtained from control medium containing 4 mg /L NAA + 0.5 mg /L BAP in MS basic nutrient medium (except Buket variety) were transformed into plants. When the findings regarding the ploidy level were evaluated, it was determined that 43% of the growing plants had haploid chromosome structure.

Keywords: Pepper, anther culture, nutrient medium, antioxidant, haploid plant

1. Giriş

Haploid bitki üretimi, bitkilerde homozigot saf hatların elde edilmesinden dolayı bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir. Bu yöntem haploidizasyon ile dihaploidizasyon olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Haploidizasyon aşamasında, gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısına (n) sahip haploid bitkiler elde edilir. Dihaploidizasyon aşamasında ise bu bitkilerin kromozom sayılarının katlanmasıyla iki katına çıkartılarak (2n), dihaploid bitkiler elde edilir. Dihaploid bitkilerde kendileme yapılarak tamamen homozigot bitkiler elde edilir (Heiser 1976; Andrews 1985; Ellialtıoğlu ve ark. 2006; Olszewska ve ark. 2014; Arı ve ark. 2016). Haploidizasyon ve dihaploidizasyon yöntemi ıslah sürecini kısalttığı için sebze ıslahında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Islahçılar için de önemli avantajlar sağlamaktadır. En önemli avantajı, kendine uyumsuz türlerde bile tamamen homozigot bitkiyi kısa bir süre içerisinde elde edilmesine olanak sağlamasıdır. Biberde dihaploid hatların elde edilmesinde anter kültürü yönteminin kullanılması 45 yıldan daha uzun zamandır kullanılmakta ve bu alanda başarı oranını artırmaya yönelik araştırmalar geniş kapsamlı şekilde devam etmektedir.

Yapılan araştırmaların sayısının çok olmasına rağmen geçerliliği bildirilmiş kurallar çok azdır (Irikova ve ark. 2011a). Bu nedenle kullanılan teknik ve yöntemdeki başarı türden türe, hatta çeşitler arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Bir araştırmada kullanılan başarılı bir yöntem ve teknik, diğer araştırmalarda aynı başarıyı göstermeyebilmektedir. Bu yüzden bitkilere uygulanan doku kültürü tekniklerinin beklenen sonucu verebilmesi için aşılması gereken birden fazla sorun bulunmaktadır. Bu sorunlar; kontaminasyon, hiperhidrisiti ve rekalsitrantlıktır. Rekalsitrantlık, bitkilerde doku kültüründe bütün aşamalarda görülen *in vitro* tekniklerin uygulamalarını önemli ölçüde kısıtlayan bir faktördür. Yani bitkinin doku, hücre ve organlarının doku kültürü tekniklerine yanıtız kalması olayıdır. Rekalsitrantlık, önemli bitki türlerinde biyoteknolojik yöntemlerinin kullanımında sınırlayıcı ve *in vitro* koruma tekniklerinin geniş uygulamalarında kullanımını azaltabilir (Benson 2000). haploid bitki eldesi düşük bitkilerde, bitki hormonu olarak tanımlanamayan poliaminler, jasonatlar, antioksidantlar, salisilatlar gibi bileşiklerin doku kültür ortamına eklenmesi ile de rekalsitrantlık sorununun ortadan kaldırılabilceği araştırmacılar tarafından tartışılmıştır (Joy ve ark. 1988; Ravnikar ve ark. 1992; Rey ve ark. 1994).

Bu çalışmanın amacı üç burun ve dolma biber tiplerinin anter kültürü tekniği ile haploid bitki eldesinde antioksidan özelliğine sahip olan salisilik asit, çinko ve askorbik asitin farklı miktarlarının besin ortamlarında kullanılmasıyla, anter dokusunda yaraya bir tepki olarak oksidatif stresin önlenip önlenememesinin tespit edilmesi ile kullanılan genotiplerin androgenik başarı üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışma için gerekli bitki materyalleri Antalya'nın Serik ilçesinde bulunan plastik seralar ve Antalya'da bulunan bir Tohum şirketine ait seralar kullanılarak yetiştirilmiştir. Doku kültürü çalışmaları ise Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait laboratuvarında ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait doku kültürü laboratuvarında 2019-2020 yılları arasında yürütülmüştür. Çalışmada bitkisel materyal olarak üç burun tipi biber olan Buket ve Üç burun genotipleri, dolma tipi biber olarak ise bir tohum şirketine ait olan B22 ve B23 genotipleri kullanılmıştır.

Çalışmada anterlerin kültüre alınmasında makro ve mikro besin elementleri ile vitaminleri içeren Murashige ve Skoog (1962) hazır besi ortamı kullanılmıştır. Ayrıca, MS besin ortamına % 0.25 oranında aktif kömür (Alremi ve ark. 2014), büyüme ve düzenleyicilerden oksin hormonu olan NAA (a-naftalin asetik asit) ve sitokin hormonu olan BAP (6-benzilaminopurin) (Çömlekçioğlu ve ark. 1999) besi ortamına Tablo 1.'de belirtilen oranlarda eklenmiştir.

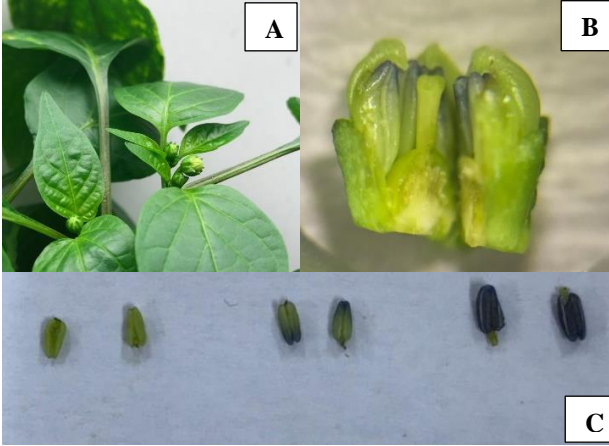
Tablo 1. Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri (K; kontrol, O; ortamlar)

ORTAMLAR	K	O1	O2	O3	O4	O5	O6
MS	+*	+	+	+	+	+	+
4 mg/L NAA	+	+	+	+	+	+	+
0.5 mg/L BAP	+	+	+	+	+	+	+
2.5 g/L Aktif kömür	+	+	+	+	+	+	+
30g/L Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+
15mg/L AgNO ₃	+	+	+	+	+	+	+
5 mg/L SA	-**	+	-	-	-	-	-
10 mg/L SA	-	-	+	-	-	-	-
1.4 mg/L Zn	-	-	-	+	-	-	-
6.4 mg/L Zn	-	-	-	-	+	-	-
25 mg/L C Vit.	-	-	-	-	-	+	-
50 mg/L C Vit.	-	-	-	-	-	-	+

*(+): Besi ortamına eklenen, **(-): Besi ortamına eklenmeyen

Çalışmada otoklavlama sırasında bozulabilen maddeler hariç tüm kimyasal maddeler ilave edildikten sonra hazırlanan besin ortamlarının pH'sı, 1N'lik HCl ile 1N'lik KOH kullanılarak 5.7-5.8'e ayarlanmıştır. Ortamların tümüne katılaştırıcı olarak 8 g/L agar ilave edilmiştir. Hazırlanmış olan besin ortamları, 121°C sıcaklık ve 1.2 kg/cm² basınçtaki otoklavda 15 dk sterilize edilmiştir. Besin ortamları steril kabin içerisinde salisilik asit ve askorbik asit filtre ile steril edilerek ortamlara eklenmiştir.

Başarılı bir anter kültürü için ilk koşul tomurcukların uygun aşamadayken toplanmasıdır. Androgenesis tekniği ile bitki elde etmede yapılması gereken ilk aşama, tek çekirdekli mikrosporları bulunduran tomurcukları (Kim ve ark. 2008; Lantos ve ark. 2009; Supena ve ark. 2006; Supena ve Custers 2011) seçebilmektir. Anterler, Parra-Vega ve ark. (2013a) belirlediği yönteme göre, tomurcukların taç yaprak uzunluklarını %80 tamamladığı, petallerin sepallerden biraz daha uzun olduğu dönemde ve anter uçlarında hafif morlaşmanın başladığı dönemde alınmıştır. Kültür için toplanan çiçek tomurcukları ve anterler aşağıda belirtilen Şekil 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. A) Bitki üzerinde çiçek tomurcuklarının görünümü B) Uygun anterlerin bulunduğu çiçek tomurcuğunun açılmış görünümü C) Farklı büyüklükteki tomurcuklardan alınan anterler

En uygun gelişme dönemine sahip olan çiçek tomurcukları hasat edildikten sonra 24 saat süreyle 4°C'de buzdolabında soğuk uygulamasına tabii tutulmuştur (Supena ve ark. 2006). Toplanan tomurcukların içlerindeki anterler çıkarılmadan steril koşullarda dezenfekte edilmiştir. Çiçek tomurcukları öncelikle 1 dakika kadar çeşme suyundan geçirildikten sonra Tween-20 % 0.05 (v/v) eklenmiş %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika bekletilmiş. Çiçek tomurcukları sterilizasyonun ardından üç kez steril saf su ile 5'er dakika olmak üzere durulanmıştır (Durna 2016).

Anterler, toplanan tomurcukların içerisinden steril bistüri ve pens yardımıyla tomurcuğun diğer parçalarından ve filamentlerinden ayrılarak çıkarıldıktan hemen sonra besin ortamı üzerine, sırt yüzeyleri besi ortamları ile temas edecek şekilde ve besi ortama batırılmaksızın aktarılmıştır. Anterlerin besi ortamlarına aktarılmasında 6 cm'lik steril plastik petri kâğıtları kullanılmıştır ve her petriye bir çiçek tomurcuğundan çıkarılan 5 anter aynı besin ortamına yerleştirilmesine özen gösterilmiştir. Çalışmada 4 genotip için toplamda 567 petri ve 2835 anter kullanılmıştır.

Anterler, 4 gün +35°C'de karanlık inkübasyonuna tabii tutulan petri kâğıtları, 4. günün sonunda 16 saat ışık (1000-3000 lux) / 8 saat karanlık olan ortamda, 25°C sıcaklığa sahip olan büyüme odasına alınmıştır. Embriyolar görülmeye başladıktan birkaç gün sonra rejenerasyon ortamı olan hormon ilave edilmemiş, %0.8 agar ve %3 sakkaroz ile desteklenen MS temel besin ortamı 6 cm steril petri kaplarına konulmuş ve embrioidler ortama transfer

edilmiştir. Çimlendirme ortamında 8-10 gün bekletildikten sonra kök gelişimi ve gerçek yaprak oluşumu başlayan bitkiler 2,5 cm çapında 12-15 cm uzunluğundaki deney tüplere aktarılmıştır. Deney cam tüplerdeki embriyolardan gelişen lateral kökleri gelişmiş 4-6 gerçek yapraklı bitkiler, içinde ½ torf+½ perlit karışımı bulunan ortamlara aktarılmıştır. Bu bitkiler 5000 lux ışık yoğunluğuna sahip, %85 hava oransal nem, 22-24°C ortam sıcaklığına 12 saat gece/gündüz koşullarında büyüme odasına aktarılmıştır. Büyüme odasında 8-10 gün bekleyen bitkiler daha sonrasında sera koşullarına alınmıştır. Bu süre zarfında bitkilerde Ploidi düzeylerinin belirlenmesinde fenotipik gözlem ve flow sitometri yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. ploidi testinin sonucunda haploid olan bitkilere, %1'lik in vivo kolhisin uygulaması genç bitkilerin büyüme ucuna mikropipet yardımıyla damlatılmasıyla kromozom katlanması sonucu dihaploid bitkiler oluşturulmuştur.

3. Bulgular ve Tartışma

Alınan anterlerde yapılan denemeler sonucunda üç farklı biber genotipinden farklı antioksidan bileşikler içeren uygulamalardan anormal embriyolar elde edilirken, kontrol uygulamasından da haploid embriyolar elde edilmiştir. Fakat ortamlar arasında genotiplere bağlı olarak embriyo eldesi bakımından önemli farklılık görülmüştür.

Üç burun genotipinde kontrol ortamından embriyo elde edilirken, diğer antioksidan içeren 6 uygulamadan 2 ortamda anormal embriyo ve 4 ortamda ise embriyo elde edilememiştir. Toplamda 2 embriyo, 8 anormal embriyo, 1 haploid bitkicik ve 1 dihaploid bitkicik elde edilmiştir. Besin ortamlarına aktarılan anterlerden gelişerek rejenerasyon ortamlarına aktararak gelişimini sürdüren ve kuruma belirtisi göstermeyerek canlılığını koruyan anterlerin oranını belirten gelişen anter oranı bakımından en yüksek değer, %70 oranı ile 25 mg/L C vitamini (O5) bulunduran kombinasyonda elde edilmiştir.

Buket genotipinde ortamların hepsine diğer 3 genotipten daha fazla anter atılmıştır, fakat buna rağmen embriyo elde edilememesinin en büyük nedeni donör bitkide meydana gelen ve ilaçlanmasına rağmen önlenemeyen batı çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis*) zararlısının olduğu düşünülmektedir. Fakat ortamlara aktarılan anterlerdeki gelişen anter oranlarına bakılacak olursa en yüksek değer %57 oranı ile 5 mg/L SA (O1) ile 6.4 mg/L Zn (O4) ortamlarında bulunmuştur.

B22 olarak kodlanmış dolma tipi biber genotipinden kontrol ortamından embriyo elde edilirken, aynı zamanda kontrol ve 25 mg/L C vitamini (O5) içeren ortamlardan anormal embriyo elde edilmiştir. Bu genotipten 1 embriyo, 2 anormal embriyo ve 1 dihaploid bitkicik elde edilmiştir. B22 genotipinde gelişen anter oranı bakımından en yüksek değer %77 oranı ile 50 mg/L C vitamini (O6) ortamından elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerden sonuncu olan B23 genotipi, önceki üç genotipe (Üç burun, Buket ve B22) göre androgenik yanıtı en yüksek olan genotip olmuştur. B23 genotipinin kontrol ortamından 4 embriyo, kontrol, 50 mg/L C vitamini (O6), 1.4 mg/L ve 6.4 mg/L Zn (O3, O4) ortamlarından toplamda 7 anormal embriyo, 2 haploid

Tablo 2. Genotiplerden farklı antioksidan maddeler içeren ortamlardaki anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Genotipler	Ortamlar	Antioksidant madde (mg/L)	Kullanılan anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı (adet)	Gelişen anter oranı (%)	Embriyo sayısı (adet)	Anormal embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşum oranı (%)	Bitki sayısı (adet)	Bitkiye dönüşüm oranı (%)
Üç burun	K	/	485	179	37	2	5	1.11	2	1.11
	O1	5 SA	30	20	67	0	0	0	0	0
	O2	10 SA	30	19	63	0	1	0	0	0
	O3	1.4 Zn	30	15	50	0	0	0	0	0
	O4	6.4 Zn	30	14	47	0	0	0	0	0
	O5	25 Vit. C	30	21	70	0	0	0	0	0
	O6	50 Vit. C	30	18	60	0	2	0	0	0
Buket	K	/	600	166	28	0	0	0	0	0
	O1	5 SA	40	23	57	0	0	0	0	0
	O2	10 SA	40	22	55	0	0	0	0	0
	O3	1.4 Zn	40	21	52	0	0	0	0	0
	O4	6.4 Zn	40	23	57	0	0	0	0	0
	O5	25 Vit. C	40	22	55	0	0	0	0	0
	O6	50 Vit. C	40	21	52	0	0	0	0	0
B22	K	/	480	194	40	1	1	0.51	1	0.51
	O1	5 SA	30	11	37	0	0	0	0	0
	O2	10 SA	40	13	32	0	0	0	0	0
	O3	1.4 Zn	30	15	50	0	0	0	0	0
	O4	6.4 Zn	40	21	52	0	0	0	0	0
	O5	25 Vit. C	30	12	40	0	1	0	0	0
	O6	50 Vit. C	30	23	77	0	0	0	0	0
B23	K	/	450	160	35	4	2	2.5	4	2.5
	O1	5 SA	30	21	70	0	0	0	0	0
	O2	10 SA	30	21	70	0	0	0	0	0
	O3	1.4 Zn	30	20	67	0	1	0	0	0
	O4	6.4 Zn	40	21	52	0	2	0	0	0
	O5	25 Vit. C	30	24	80	0	0	0	0	0
	O6	50 Vit. C	40	19	47	0	2	0	0	0

bitkicik ve 2 dihaploid bitkicik elde edilmiştir. Gelişen anter oranı bakımından en yüksek değer %80 oranıyla 25 mg/L C vitamini (O5) içeren ortamdan elde edilmiştir.

B23 genotipinde diğer genotiplere göre daha fazla sağlıklı ve anormal embriyo ve bitki gelişimi meydana gelmiştir. Bu durum aynı dönem içerisinde kültüre alınan anterlerin farklı genotiplerde değişik reaksiyonlar göstermesi ile ilgili olup benzer sonuçlar Mityko ve ark. (1995); Dias ve Martins, (1999); Çömlekçioğlu ve ark. (2001); Ercan ve ark. (2001); Çiner ve Tıprıdamaz (2002); Koleva-Gudeva ve ark. (2007) ve Taşkın ve ark. (2011) tarafından bildirilmiştir (Tablo 2).

Embriyo başarısı yüksek genotiplerin yanında düşük başarı gösteren genotipler de olmuştur. Yapılan androgenesis çalışmalarında genotip, besin ortamı ve diğer sebeplere bağlı olarak embriyo oluşumunda ve bitkiye dönüşümünde farklılıkların olduğu belirtilmektedir (Morrison ve ark. 1986; Bajaj 1990; Mityko ve ark. 1995; Dolcet-Sanjuan ve ark. 1997; Dias ve Martins 1999; Rodeva ve ark. 2004; Koleva-Gudeva ve ark. 2007; Ata 2011; Parra- Vega ve ark. 2013b).

Bizim çalışmamızda özellikle ortamlarda kullanılan bazı antioksidantlardan gelişen anter oranı yüksek olmasına rağmen embriyoya dönüş oranları düşük kalmıştır.

Ortamlarda kullanılan antioksidanlara göre genotiplerde gelişen anter oranı %80 (25 mg/L C vitamini) ile %32 (10 mg/L SA) arasında değişmiştir. Her genotip için ortamlarda anter gelişimi sağlanmıştır. Özellikle antioksidanlar içerisinde 25 mg/L C vitamini içeren ortamlara aktarılan genotiplerde gelişen anter oranı bakımından en yüksek sonuç elde edilmiştir. Bunu 50 mg/l C vitamini, 5 mg/l SA, 10 mg/L SA, 1.4 mg/L Zn, 6.4 mg/L Zn ve kontrol ortamları izlemiştir. Fakat anter gelişimi sağlanan antioksidan içeren ortamlardan sağlıklı embriyo ve bitki gelişimi sağlanamamıştır. Irikova ve ark. (2011b), biberde anter kültürü çalışmalarında başarı oranının uygulamalara bağlı olarak değişebildiğini belirtmektedir. Özellikle genotiplere göre değişen kontrol ortamında gelişen anter oranı düşük olmasına rağmen çalışmada sadece bitkiye dönüşüm bu ortamlardan meydana gelmiştir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan biber tiplerinde (üç burun ve dolma) gelişen anter oranları bakımından karşılaştırdığımızda %52 oranıyla

Tablo 3. Genotiplerde kullanılan tomurcuk sayısı, tomurcuk başına embriyo ve tomurcuk başına bitki oranları (%)

Genotip	Ortamlar	Antioksidan madde (mg/L)	Tomurcuk sayısı (adet)	Tomurcuk başına embriyo oranı (%)	Tomurcuk başına bitki oranı (%)
Üç burun	K	/	97	0.021	0.021
	O1	5 SA	6	0	0
	O2	10 SA	6	0	0
	O3	1.4 Zn	6	0	0
	O4	6.4 Zn	6	0	0
	O5	25 Vit. C	6	0	0
	O6	50 Vit. C	6	0	0
Buket	K	/	120	0	0
	O1	5 SA	8	0	0
	O2	10 SA	8	0	0
	O3	1.4 Zn	8	0	0
	O4	6.4 Zn	8	0	0
	O5	25 Vit. C	8	0	0
	O6	50 Vit. C	8	0	0
B22	K	/	96	0.010	0.010
	O1	5 SA	6	0	0
	O2	10 SA	8	0	0
	O3	1.4 Zn	6	0	0
	O4	6.4 Zn	8	0	0
	O5	25 Vit. C	6	0	0
	O6	50 Vit. C	6	0	0
B23	K	/	90	0.044	0.044
	O1	5 SA	6	0	0
	O2	10 SA	6	0	0
	O3	1.4 Zn	6	0	0
	O4	6.4 Zn	8	0	0
	O5	25 Vit. C	6	0	0
	O6	50 Vit. C	8	0	0

dolma tipi biberin, %48 oran ile üç burun biber tipinden daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu durum ise biber tiplerinin tomurcuk boyutlarına, mikrospor içeriğine ve yetiştirildiği koşullara bağlı olarak değişiklik gösterdiği düşünülmektedir.

Aynı zamanda genotiplerde kullanılan tomurcuk sayısı, tomurcuk başına embriyo oranı ve tomurcuk başına bitki oranlarına bakıldığı zaman en fazla çiçek tomurcuğu Buket genotipinden kullanılırken, en az ise B23 genotipi olan dolma tipi biberden kullanılmıştır (Tablo 3).

Ploidi testi için flow sitometri yönteminden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, embriyolardan gelişen bitkilerden %43'ünün haploid kromozom yapısına, %57'sinin ise diploid kromozom yapısına sahip olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Çömlekçioglu ve ark. (2001), androgenesis tekniği ile elde edilen bitkilerin haploid kromozom sayısına sahip olabildiklerinin yanında aynı zamanda kültür koşullarında bitkilerin kendiliğinden (spontan) katlandığı ve spontan dihaploid kromozom sayısına sahip bitkilerin elde edildiğini bildirmektedir. Yaptığımız çalışmada da benzer şekilde haploid bitkilerin yanı sıra dihaploid bitkilerde elde edilmiştir.

4. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda kontrol ortamı olan, 4 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS ortamı embriyo oluşumu üzerine olumlu etki yapmıştır. Fakat besin ortamlarına belli dozlarda eklenen SA, Zn ve C vitaminleri bitkicik oluşumuna etkili olmazken, embriyo oluşumuna az da olsa olumlu yönde etkisi görülmüştür. Antioksidan uygulamalarından başarı oranı gelişen anter bakımından C vitamini, SA, Zn ve kontrol olarak sıralanırken, bitkicik oluşumu sadece kontrol ortamından gerçekleşmiştir. Bunun nedeni ise kontrol ortamında kullanılan yüksek miktardaki anter sayısından kaynaklanabilir.

Anter kültürü çalışmalarından embriyogenik başarı üzerine besin ortamı bileşiminin ve genotipin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda embriyo oluşumunun yeterli olmadığı ve gelişen anterlerin embriyoya dönüşüm oranı bakımından yeni çalışmalar yürütülerek kullanılan antioksidan bileşiklerde en uygun şekilde kullanılması gerektiği anlaşılmıştır. Başarı oranının çok yüksek olmamasıyla birlikte, özellikle C vitamini ve/veya Zn ortamlarının seçilerek yine de tek bir ortam üzerinde uygun

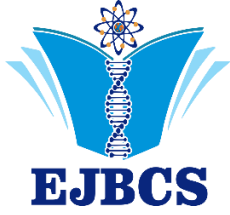
dozun belirlenmesiyle istenilen sayıda haploid / spontan dihaploid bitki elde edilebileceği düşünülmektedir.

Açıklama: Bu çalışma APC tarafından hazırlanan “Anter Kültürü Tekniği ile Dihaploid Nitelikli Üç Burun ve Dolma Tipli Biber Hatlarının Geliştirilmesi” isimli Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

Kaynaklar

- Alremi F, Taşkın H, Sönmez K, Büyükalaca S, Ellialtıoğlu Ş. 2014. Biber (*Capsicum annuum* L.)’de genotip ve besin ortamının anter kültürüne etkileri. *Turk. J. Agric. Nat. Sci.* 2: 108-116. doi: 10.30910/turkjans.160702
- Andrews J. 1985. Peppers, The Domesticated Capsicum, University of Texas Pres, Austin, Texas.
- Arı E, Yıldırım T, Mutlu N, Büyükalaca S, Gökmen Ü, Akman E. 2016. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk. J. Biol.* 40:944-954. doi:10.3906/biy-1509-36
- Ata A. 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) Anter kültüründe mevsim etkisi ve mikrospor gelişimi (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- Bajaj YPS. 1990. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 12, Haploids in Crop Improvement I*. Springer, Berlin, s. 3-44.
- Benson EE. 2000. In vitro plant recalcitrance an introduction. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36:141-148. doi:10.1007/s11627-000-0029-z
- Çiner D, Tıprıdamaz R. 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk. J. Bot.* 26:131-139. doi:10.30910/turkjans.
- Çömlekçiöğlü N, Büyükalaca S, Abak K. 1999. Şanlıurfa ve kahramanmaraş biber populasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, 897-900.
- Çömlekçiöğlü N, Büyükalaca S, Abak K. 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). XI. th. Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, April 9-13, Antalya, 133-136.
- Dias JS, Martins MG. 1999. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different Brassica oleracea morphotypes. *Sci. Hort.* 82:299-307. doi:10.1016/S0304-4238(99)00052-7
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Huerta A. 1997. Androgenesis (*Capsicum annuum* L.) effects of carbon dioxide enrichment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122:468-475. doi:10.21273/JASHS.122.4.468
- Durna P. 2016. Bazı biber genotiplerinde in vitro androgeensis uygulamalarının dihaploid hat geliştirmeye etkisi ve dihaploid hatların morfolojik karakterizasyonu (Doktora Tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Tokat.
- Ellialtıoğlu Ş, Başay S, Kuşvuran Ş. 2006. Anter kültüründen elde edilen haploid patlıcanların katlanması amacıyla kullanılan in vitro ve in vivo kolhisin uygulamalarının karşılaştırılması. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, Eylül 19-22, Kahramanmaraş, 386-390.
- Ercan N, Boyacı F, Ayar F. 2001. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı besin ortamlarının etkisi. GAP II. Tarım Kongresi, Ekim 24-26, Şanlıurfa, 1:121-128.
- Heiser CBJR. 1976. Peppers, in evolution of crop plants. Longman Sci. 265-268.
- Irikova T, Grozeva S, Rodeva V. 2011a. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. *Acta Phys. Plant.* 33:1559-1570. doi:10.3906/biy-1506-79
- Irikova T, Grozeva S, Popov P, Rodeva V, Todorovska E. 2011b. In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype culture medium and duration of cultivation. *Biotech. & Biotech. Equip.* 25:2604-2609. doi:10.5504/BBEQ.2011.0090
- Joy RW, Patel KR, Thorpe TA. 1988. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 13:219-228. doi:10.1007/BF00043670
- Kim M, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon M, Lee Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant. Cell. Rep.* 27:425-434. doi:10.1007/s00299-007-0442-4
- Koleva-Gudeva LR, Spasenoski M, Trajkova F. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture, the effect of incubation treatments and different media. *Sci. Hort.* 111:114-119. doi:10.1016/j.scienta.2006.10.013
- Lantos C, Juhász AG, Somogyi G, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, Pauk J. 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 97:285-293. doi:10.1007/s11240-009-9527-9
- Mityko J, Andrasfalv A, Csillery G, Fari M. 1995. Anther-culture response in different genotypes and fl hybrids of pepper *Capsicum annuum* L. *Plant Breed.* 114:78-80. doi:10.1111/j.1439-0523.1995.tb00764.x
- Morrison R, Koning RE, Evans DA. 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of Capsicum. *J. Plant. Phys.* 126:1-9. doi:10.1016/S0176-1617(86)80210-3
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.* 15:473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Olszewska D, Kisiala A, Niklas- Nowak A, Nowaczyk P. 2014. Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus Capsicum. *Turk. J. Biol.* 38:118-124. doi:10.3906/biy-1307-50
- Parra- Vega V, Gonzalez- Garcia B, Segui-Simarro JM. 2013a. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta. Phys. Plant.* 35: 627-633. doi:10.1007/s11738-012-1104-x
- Parra- Vega V, Renau- Morata B, Sifres A, Segui-Simarro JM. 2013b. Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* 112:353-360. doi:10.1007/s11240-012-0242-6
- Ravnikar M, Vilhar B, Gogala N. 1992. Stimulatory effects of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. *J. Plant. Growth. Reg.* 11:29-33. doi:10.1007/BF00193840
- Rey M, Díaz-Sala C, Rodríguez R. 1994. Exogenous polyamines improve rooting in hazel microshoots. *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* 36:303-308. doi:10.1007/BF00046087
- Rodeva VN, Irikova TP, Todorova VJ. 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. *Biotech. & Biotech. Equip.* 18(3):34-38. doi:10.1080/13102818.2004.10817117

- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, Custers JBM. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant. Cell. Rep. 25:1-10. doi:10.1007/s00299-005-0028-y
- Supena EDJ, Custers JBM. 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Sci. Hort. 130:769–774. doi:10.1016/j.scienta.2011.08.037
- Taşkın H, Büyükalaca S, Keleş D, Ekbiç E. 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. Afr. J. Biotech. 10:17116-17121. doi:10.5897/AJB11.2023



Urtica dioica L. Özütlelerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi

Sevilay Çolak^{1*}, Nazan Çömlekciolu¹, Ashabil Aygan¹

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye

*Corresponding author : sevilay190323@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-3366-1326>

Received : 04/05/2020
Accepted : 06/12/2020

Özet: *Urtica dioica* L. (ısırgan otu) bitkisi endüstride, kozmetikte ve tıp alanında yaygın kullanıma sahip olup uzun zamandır halk tarafından fitoterapötik uygulamalarda kullanılmaktadır. Ekonomik potansiyeli olmasına rağmen hala kültürü yapılmayıp yabani olarak tüketilmektedir. Bu çalışmada, farklı yöntemlerle elde edilen ısırgan özütlelerinin, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra özütlelerin yağ içeriği gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilmiştir. GC-MS analizi sonucunda 12 farklı yağ asidi belirlenmiştir. Isırgan otu özütlelerinin başlıca yağ asidi bileşenlerini linoleik asit (%61.40), oleik asit (%14.66) ve palmitik asit (%10.42) oluşturmaktadır. Ultrasonik banyonun (USB), fermentasyon ve su ile kaynatma yöntemlerine nazaran özütlelerin biyoaktif içeriklerini ortaya çıkarmada daha etkili olduğu görülmüştür. USB ile elde edilen bitki özütlelerinin toplam fenolik madde değeri 13.26 mg g⁻¹, toplam flavonoid miktarı 3.07 mg g⁻¹, FRAP değeri 21.53 µg g⁻¹ ve DPPH değeri 6.20 mg g⁻¹ bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre, etanol özütü, suyla yapılan özütlere göre bakteriler üzerine daha iyi bir inhibisyon etki gösterirken özütlelerin hiçbiri *Candida albicans*'a karşı etkinlik göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, biyoaktif bileşikler, yağ asidi, *Urtica dioica*

Investigation of antioxidant and antimicrobial activities of Urtica dioica L. plant extracts

Abstract: *Urtica dioica* L. (nettle) has been widely used in industry, cosmetics and medicine and has long been used by the public in phytotherapeutic applications. Despite its economic potential, it is still not cultivated but consumed as wild. In this study, total phenolic and flavonoid content, antioxidant and antimicrobial activities of nettle extracts obtained by different methods were investigated. In this study, antioxidant and antimicrobial activities of nettle extracts obtained by different methods and the oil content of the extracts was analyzed by GC-MS. As a result of GC-MS analysis, 12 different fatty acids were determined. The main fatty acid components of nettle extracts were linoleic acid (61.40%), oleic acid (14.66%) and palmitic acid (10.42%). Ultrasonic bath was found to be more effective in extracting bioactive contents of extracts than fermentation and water boiling methods. Total phenolic content of plant extracts obtained by USB method was 26.78 mg g⁻¹, total flavonoid amount was 3.07 mg g⁻¹, FRAP value was 21.53 µg g⁻¹ and DPPH value was 6.20 mg g⁻¹. According to antimicrobial activity results, ethanol extracts showed a better inhibition effect on bacteria than water extracts, but none of the extracts were found to be effective against *Candida albicans*.

Keywords: Antimicrobial activity, antioxidant activity, bioactive compounds, fatty acid, *Urtica dioica*

© EJBACS. All rights reserved.

1. Giriş

Türkiye'de doğal olarak yetişen 12.000'den fazla bitki taksonu olup bunların yaklaşık üçte biri endemik taksonlardan oluşmaktadır (Güner ve ark. 2012). Bitkileri doğrudan kullanmak yerine özütlelerini kullanmak daha güvenli, kolay ve etkilidir. Böylece bitkilerden, istenmeyen bileşenler uzaklaştırılarak, istenen bileşen saf ve daha çok miktarlarda elde edilebilir (Karakaş 2003; Mohammed ve ark. 2018; Pehlivan ve Sevindik 2018).

Biyoaktif bileşikler insan fizyolojisinde, esas olarak hastalıkların önlenmesinde etkin bir rol oynamaktadır. Bitkilerin tıbbi faydaları, antioksidan özelliklere sahip fenolik bileşiklerin yanı sıra uçucu yağlar, terpenoidler veya anti-enflamatuar özelliklere sahip saponinler gibi sekonder bileşiklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Sevindik ve ark. 2017; Hossen ve ark. 2019; Mohammed ve ark. 2019).

Urticaceae familyası, 12 cins ve Tropikal Asya, Afrika ve Güney Amerika merkezli çeşitli ve kozmopolit bir bitki alanı oluşturan 200 türü içermektedir (Huang ve ark. 2019). Urticaceae familyasındaki bitkilerin büyük bir kısmı, çok yıllık olup diğerleri ise tek yıllık gelişim göstermektedir. Genelde otsu habitusa sahip olmakla birlikte çalı formunda olanları da mevcuttur (Ayan ve ark. 2006). Isırgan otu (*U. dioica*), Urticaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir (Martínez-Aledo ve ark. 2020). Isırgan otu (*Urtica spp.*) her iki yarım kürenin tropik ve subtropik bölgelerinde yetişmektedir (Manganelli ve ark. 2005). Dünya çapında ılıman ve tropikal arazilerde yetişirken, ülkemizde açık orman alanlarda, nehir ve yol kenarlarında, terk edilmiş kullanılmayan alanlarda kendiliğinden yetişen bir bitkidir (Davis 1988; Krystofova ve ark. 2010). Anadolu'daki yöresel adları "dızlağan, çızlağan, cızgan, dalagan, cınçar, ağdalak, ısırgı ve ısırganotu"dur (Baytop 1999). Bünyesindeki çok yönlü kimyasal zenginliklerinden dolayı tüm bitki kısımları geçmişten günümüze halk hekimliği, gıda, boya, lif sanayi, gübre ve kozmetik amaçlarla kullanılmaktadır (Manganelli ve ark. 2005). Bu özellikleri ile ısırganotu hem bir tıbbi bitki hem de bir lif bitkisi olarak büyük bir potansiyele sahiptir (Ayan ve ark. 2006). Isırganlar, fitosteroller, saponinler, flavonoidler, tanenler, steroller, yağ asitleri (palmitik ve stearik), karotenoidler, klorofiller, proteinler, amino asitler ve vitaminler dahil üzere tıbbi öneme sahip farklı organik bileşik sınıfları içerir (Rita-Carvalho ve ark. 2017). Isırgan otunun yapısında bulunan kimyasal maddeler, ısırgan otunun antiseptik, bakterisid, kan dolaşımı ajanı, diüretik, hemostatik ve kas hareketi düzenleyici olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Karakaş 2003). Çeşitli fitokimyasallar ve içerdikleri oranlar nedeniyle, ısırgan hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı belirgin bir aktivite gösterir (Kregiel ve ark. 2018). *U. dioica*, uzun süre tıbbi bir bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Geleneksel olarak kardiyovasküler bozuklukların, özellikle hipertansiyonun kontrolünde kullanılmış, yaprak özütünün vivo glikoz homeostazını iyileştirdiği bildirilmiştir (Dhouibi ve ark. 2019). Ancak sadece son zamanlarda anti-oksidan, antimikrobiyal, anti-ülser, analjezik ve anti-kanser özellikleri için incelenmiştir (Durak ve ark. 2004; Gul ve ark. 2012; Jinous ve ark. 2012; Nahata ve ark. 2012; Upton ve ark. 2013; Fattahi ve ark. 2013; Mohammadi ve ark. 2016). *U. dioica* kökü prostat hiperplazisinin bazı etkilerini önleyebilmektedir. (Dhouibi ve ark. 2019). Bitkinin özellikle köklerinde bulunan histamin diüretik olup prostat büyümesini önleyici özelliğindedir (Kondrad ve ark. 2000; Du ve ark. 2002). Isırgan yaprağı özleri, romatoid artrit için anti-enflamatuar ilaçlar olarak kullanılır. *U. dioica* özütü, meme kanseri hücrelerinin paklitaksele duyarlılığını önemli ölçüde arttırmıştır (Dhouibi ve ark. 2019). Birçok çalışma, *U. dioica*'nın anti-kanser özelliklerini göstermiştir. *U. dioica* özütlerinin anti-kanser kabiliyeti hakkındaki ana çalışmalar, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin önlenmesi ve tedavisi için *U. dioica*'nın nutrasötik bir gıda olarak kullanılması için umut verici bir şans sağlamıştır. Bu nedenle, *U. dioica*, mevcut anti-kanser tedavilerinin yan etkilerini göstermeden

kanseri önlemek veya azaltmak için kanser tedavisinde biyoaktif bir besin olarak kullanabilmek mümkündür (Esposito ve ark. 2019).

Bu çalışmanın amacı, *U. dioica*'dan elde edilen özütlerin biyoaktif bileşen ve antioksidan aktivitesinin yanı sıra antimikrobiyal aktivitesini araştırmaktır. Ayrıca özütler GC-MS yardımıyla analiz edilerek, bitkinin yağ asidi profili incelenmiştir. Bu çalışma, *U. dioica* üzerinde, geleneksel yöntemlerle kapsamlı olarak yapılan ilk çalışmadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan *U. dioica* bitkisine ait örnek, 2019 yılının Nisan ayında Hatay İskenderun'da yetiştiği doğal alanlardan toplanmıştır. Toplanan toprak üstü kısımları, bekletilmeden laboratuvara getirilmiş ve taze olarak deneysel araştırmalarda kullanılmıştır.

2.2. Örnek Hazırlığı

U. dioica bitkisinin toprak üstü kısımları ince bir şekilde doğranarak özütlemeye için hazır hale getirilmiştir.

2.3. Özütlemeye Yöntemi (USB Yöntemi)

Bu çalışmada 3 farklı özütlemeye yöntemi uygulanmıştır. Isırganın halk tarafından kullanımı göz önüne alınarak ilk iki yöntem geleneksel olarak dizayn edilmiştir. Bu yöntemlerde su kullanılarak fermentasyon ve kaynatma ile özütlemeye yapılmıştır. Fermentasyon yönteminde, taze bitki duran bottle içerisine konulup, üzerine 100 °C de su eklendikten sonra ağzı sıkı bir şekilde kapatılarak 24 saat boyunca sıcak bir ortamda muhafaza edilmiştir. 24 saat sonra süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci özütlemeye yöntemi olan kaynatmada, 30 dakika boyunca bitki su ile kaynatılarak hazırlanmıştır. Miliauskas ve ark. (2004)'ın yöntemi modifiye edilerek yapılan üçüncü özütlemeye yönteminde çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Taze bitki örneğinden 50 g tartılmış bir beherin üzerine 500 mL %80'lik etanol çözücüsünden eklendikten sonra, ultrasonik su banyosunda 1 saat sonike edilmiştir. Tüm yöntemlerde özütlemeyi takiben örnekler, 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Özütlerdeki çözücünün fazlası vakumlu rotary evaporatör aracılığıyla uzaklaştırılmış ve elde edilen kuru özüt analize kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.4. Bitki Özütlerinin Yağ İçeriği ve Yağ Asidi Kompozisyonunun Belirlenmesi

Soksalet yöntemiyle elde edilen sabit yağ içerisindeki yağ asitlerinin analizi GC-MS ile Rivera-Rangel ve ark. (2018)'a göre yapılmıştır. GC-MS analizleri Shimadzu GC 2025 sistemi ile gerçekleştirilmiştir. TRCN-100 (60 m x 0.25 mm x 0.20 µm film thickness) SE-54 fused silika kapiler kolon kullanılmıştır. Elektron enerjisi 70 eV'tur. Enjeksiyon miktarı 1 µL' dir. Numunelerin analizi 80 °C'de 2 dakika bekletildikten sonra dakikada 5°C artırılıp 140 °C sıcaklığa ulaştıktan sonra, bu sıcaklıkta 2 dakika tutulmuştur. Bu işlemi takiben, dakikada 3°C'lık bir artışla 240 °C'da 5 dakika daha bekletilmiştir. Toplam analiz süresi 61 dakika olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyonlar split modda (1:50) 240 °C ısıda gerçekleştirilmiştir ve dedektör

sıcaklığı 250 °C'dir. Helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılıp ve akış hızı 30 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Kullanılan gaz akışları H₂=40 mL/dk ve kuru hava=400 mL/dk olarak belirlenmiştir.

2.5. Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

2.5.1. Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi

Örneklerin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu Rekaktif (FCR) yöntemi kullanılarak Blainski ve ark. (2013)'ın prosedürü modifiye edilerek yapılmıştır. Standart olarak gallik asit (Sigma) kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyonlar spektrofotometrede (Perkin-Elmer Lambda EZ 150, USA) 750 nm'de okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri gallik asit çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru örnek ağırlığı cinsinden verilmiştir.

2.5.2. Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

Bitki özütlendeki toplam flavonoid içeriği Chang ve ark. (2002)'a göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Standart solüsyon farklı konsantrasyonlarda (25-200 µg/mL) yukarıdaki prosedüre göre hazırlanan quercetin (Sigma) ile hesaplanmıştır. Absorbans 415 nm'de spektrofotometrede okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri µg quercetin eşdeğeri/g kuru örnek ağırlığına dönüştürülmüştür.

2.5.3. DPPH metodu

Antioksidan kapasite (serbest radikallerin indirgenme kapasitesi) Brand-Williams ve ark. (1995) tarafından tanımlanan DPPH metodu modifiye edilerek belirlenmiştir. Her bitki özütünden seyreltilerek beş farklı konsantrasyonda solüsyon hazırlanmıştır. Sonuçlar, DPPH serbest radikallerinin %50'sini indirgemek için gereken konsantrasyon değeri olan IC₅₀ olarak gösterilmiştir. Tüm deneyler üç tekerrürlü olarak yapılmış ve askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.5.4. FRAP metodu

FRAP yöntemi Benzie ve Strain (1996)'a göre yapılmıştır. Bitki özütlendeki 50 µL, 2mL'lik ependorf tüplerine aktarılmış ve üzerine 600 µL FRAP ajanı eklenmiştir. Absorbans 593 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar askorbik asit (100-1000 µmol/L) kalibrasyon grafiği kullanılarak µmol askorbik asit eşdeğeri/g kuru bitki ağırlığı olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar µmol/g kuru bitki ağırlığı olarak verilmiştir.

2.6. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Elde edilen özütlendeki antimikrobiyal aktivite varlığı oyuk agar metodu kullanılarak belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *MRSA* (Metsilin Dirençli *Staphylococcus aureus*), *Sarcina lutea* ATCC 9341NA, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* olmak üzere klinik izolatlar ve standart suşlar kullanılmıştır. Test mikroorganizmaları 24 saat önceden LB (Luria-Bertani) ve Sabouraud dextrose broth besiyerlerine ekilerek 0.5 McFarland standart turbiditesine karşılık gelen (1x10⁸ bakteri ve 0.5-3x10⁴ maya/mL) steril serum fizyolojik ile sulandırılmış kültürlerden 0.1 mL alınarak otoklavdan

sonra 50-55 °C'ye kadar soğutulan Müeller Hinton Agar ve Sabouraud Dextrose Agara aşılama yapıldıktan sonra petrilere dökülmüştür. Oda sıcaklığında katılaştıran petrilere 4 mm çapında aseptik kurallara uygun bir şekilde çukurcuklar açılmıştır. Bitki özütlendeki DMSO içerisinde çözülmüştür (16 mg/mL). Daha sonra hazırlanan özütlendeki bu çukurcuklara mikropipet yardımı ile 100 µL eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan petrilere 45 dakika kadar buzdolabında bekletildikten sonra, bakteri kültürleri 37 °C'de 24 saat, mantar aşılama petrilere ise 25 °C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür. Ayrıca DMSO (50 µL) çözücü kontrolü olarak kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite gösteren bitki özütlendeki daha sonra farklı konsantrasyonlarda bitki özütü içeren Mueller Hinton Broth ve Sabouraud Dextrose Broth içerisinde MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) değerleri belirlenmiştir (Collins ve ark.1989). MİK değerleri, gözlemlenebilir büyümeyi/bulanıklığı önleyen tüplerdeki en düşük özüt konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir.

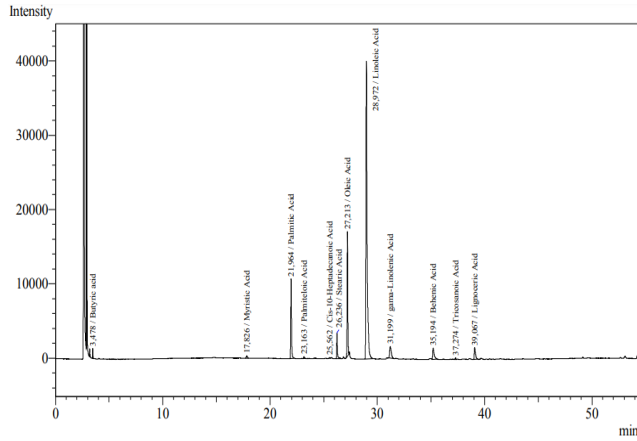
3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Yağ Asidi Kompozisyonuna Ait Sonuçlar

U. dioica bitkisine ait yağın sabit yağ asidi kompozisyonları GC-MS analizleri sonucunda ortaya çıkartılmıştır. GC-MS analizi sonucunda elde edilen yağ asidi kompozisyonuna ait veriler Tablo 1.'de ve GC-MS kromatogramları Şekil 1.'de verilmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre; soksaleit özütlemesi sonucunda bitki özütlendeki ham yağ miktarı %5.25 olarak elde edilmiştir. GC-MS analizi sonucunda 12 farklı yağ asidi belirlenmiş olup, %79.61'lik bir oranda doymamış yağ asitlerinden, %20.39'luk bir kısmının ise doymuş yağ asitlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Tabloda 1.'de görüldüğü gibi *U. dioica* özütlendeki sabit yağın başlıca bileşenlerini linoleik (%61.40), oleik (%14.66) ve palmitik (%10.42) asitlerin oluşturduğu görülmektedir. Sonuçlar ayrıca *U. dioica* yağının doymamış yağ asitleri (%79.6) bakımından zengin olduğunu gösterirken, bu oranın çoğunluğunu çoklu doymamış yağ asitleri (%64.62) oluşturmaktadır. Bitkisel yağların yağ asidi bileşimi, yağın kullanımı hakkında daha fazla bilgi verir. Genellikle, yağ asidi bileşimi, bir yağın besleyiciliği veya teknik uygulamalarda kullanımları için belirleyicidir (Çömlekçioğlu ve ark. 2020). Isırgan otunun içerdiği bileşenlerden, bir omega-3 yağ asidi olan linolenik ve linoleik asitler gibi gerekli yağ asitleri potansiyel antikanserijen maddelerdir (Kelley ve ark. 2007; PCF 2007; Rochfort ve ark. 2008; Kan ve ark. 2009; Korkmaz 2010). Omega 3 (alfa-linoleik asit), omega 6 (linoleik asit) ve omega 9 (oleik asit)'dan oluşan omega yağ asitlerinin beyin gelişimi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, koroner kalp hastalıklarının önlenmesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Eseceli ve ark. 2006). Yetersizliklerinde insanlarda ciltte kuruma gibi bazı deri hastalıkları, astım, artritis, büyümede gerileme, şeker ve kanserin bazı türlerinin yanında öğrenme eksikliği de görülmektedir (Lewis ve ark. 2000).

Tablo 1. *U. dioica* bitki özütlerinin yağ asidi kompozisyonları (%)

Karbon Sayısı	Yağ asidi	İçerik (%)	
1	C4:0	Butirik asit	0.58
2	C14:0	Miristik Asit	0.41
3	C16:0	Palmitik Asit	10.42
4	C18:0	Stearik Asit	3.56
5	C21:0	Behenik Asit	2.82
6	C23:0	Tricosanoic Asit	0.15
7	C24:0	Lignoserik Asit	2.45
Doymuş Yağ Asitleri Toplamı		20.39	
8	C16:1	Palmitoleik Asit	0.21
9	C17:1	cis-10-Heptadekanoik asit	0.12
10	C18:1	Oleik Asit	14.66
Tekli Doymamış Yağ Asitleri Toplamı		14.99	
11	C18:2	Linoleik Asit	61.40
12	C18:3	Gama-Linolenik Asit	3.22
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Toplamı		64.62	

**Şekil 1.** *U. dioica* özütlerinden elde edilen GC-MS kromatogramı

3.2. Toplam Fenol, Flavonoid İçerikleri ve Antioksidan Aktivitesine Ait Sonuçlar

Yüksek içerikli ve yüksek biyolojik aktiviteye sahip flavonoidlerin ve fenoliklerin özütlemesi ve ayrılması, ilaç, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisi için çok önemlidir (Zhu ve ark. 2010). Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, antioksidan özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür ve biyolojik sistemlerle potansiyel olarak etkileşime girebilir ve antikanser, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktivitede önemli bir rol oynayabilirler (Wang ve ark. 2003; Abu-Reidah ve ark. 2013; Mohammed ve ark. 2020).

Analiz sonuçlarına göre etanol özütün fenol değeri 26.78 ± 0.14 mg GAE g^{-1} , su ile kaynatılmış özütün fenol değeri 16.47 ± 3.72 mg GAE g^{-1} , su ile fermentasyon özütünün fenol değeri ise 11.21 ± 0.93 mg GAE g^{-1} olarak bulunmuştur. Bitkinin flavonoid değeri etanol, su ile kaynatılmış ve su ile fermentasyon özütlerinde sırasıyla 3.07 ± 0.05 , 2.15 ± 0.18 , 1.84 ± 0.04 μg QE g^{-1} ; FRAP sonuçları ise yine sırasıyla 21.53 ± 1.13 , 10.29 ± 0.44 ve 8.55 ± 2.69 μg AAE g^{-1} olarak belirlenmiştir. Bitkinin DPPH sonuçlarına baktığımızda ise etanol özütünün 6.20 ± 0.41 mg g^{-1} su ile kaynatılmış özütünün 13.77 ± 0.89 mg g^{-1} ve son olarak su ile fermentasyon özütünün 10.02 ± 0.92 mg g^{-1} değerleriyle sonuçlanmıştır (Tablo 2). Yapılan analizlerin tümünde etanol çözücüsüyle elde edilen özütlerin çözücüsü su olan özütler nazaran daha yüksek sonuçlar verdiği görülmüştür. Pourmorad ve ark. (2006), İran'ın kuzeyinden topladıkları bazı tıbbi bitkilerin antioksidan aktivitesi, fenol ve flavonoid içeriğini araştırmışlardır. *U. dioica*'ya ilişkin flavonoid miktarını 43.3 ± 0.37 mg/g, fenolik içeriğini 24.1 ± 1 mg/g, DPPH yöntemini kullanarak ölçülen antioksidan aktivitesi IC₅₀ değerini ise 1.45 mgml⁻¹ olarak bulmuşlardır. Koczka ve ark. (2015) ise, yaptıkları çalışma ile bitkinin toplam fenol içeriği ile antioksidan kapasitesini karşılaştırmışlardır. Bitkinin yaprak organından sulu ve etanolik özütler hazırlamışlar ve fenolik miktarlarını, sulu özütlerde 0.929 ile 2.385 mg GAE/L ve etanolik özütlerde 0.965 ile 1.992 mg GAE/L, antioksidan kapasite FRAP değerlerini, sulu özütlerde 3.980 ila 9.104 mM AA/L, etanolik özütlerde 1.987 ila 5.265 mM AA/L arasında değişmekte olduğunu bulmuşlardır. Yapmış oldukları bu çalışma ile toplam fenol içeriği ve antioksidan kapasitenin sulu özütlerde etanolik özütlerden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Fakat bu çalışmada, etanolik özütün daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Yapılan bir diğer analizde; Kukrić ve ark. (2012), Banja Luka bölgesinden topladıkları *U. dioica*'nın toplam fenollerin, flavonoidlerin, flavonollerin yanı sıra enzimatik olmayan antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivitenin içeriğini araştırmışlardır. *U. dioica*'nın yapraklarından elde ettikleri, çözücüsü etanol olan özütte ısrırgan otu özütindeki toplam fenolik içerik 208.37 mg GAE/gdw, toplam flavonoidlerin içeriği 20.29 mg QE/gdw ve toplam flavonollerin içeriği 22.83 mg QE/gdw olarak bulmuşlardır. Bu değerler bu çalışmada elde edilen değerlerin üstündedir. Aynı zamanda, FRAP yöntemi ile saptanan antioksidan aktivite 7.50 mM Fe (II)/gdw iken, IC₅₀ değerleri ile DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak ölçülen antioksidan aktivite sırasıyla 31.38 ve 23.55 μg mL⁻¹ olarak bulmuşlardır. Bu çalışmaya kıyasla, ısrırgan otunun antioksidan kapasitesini daha zayıf bulmuşlardır.

Tablo 2. *U. dioica* bitki özütlerinin fenol-flavonoid- FRAP ve DPPH içerikleri ile antioksidan aktivitesi

	Fenol (mg GAE g ⁻¹)	Flavonoid (µg QE g ⁻¹)	FRAP (µg AAE g ⁻¹)	IC ₅₀ Değeri (DPPH%) (mg ml ⁻¹)
USB	26.78 ± 0.14	3.07 ± 0.05	21.53 ± 1.13	6.20 ± 0.41
SK	16.47 ± 3.72	2.15 ± 0.18	10.29 ± 0.44	13.77 ± 0.89
SF	11.21 ± 0.93	1.84 ± 0.04	8.55 ± 2.69	10.02 ± 0.92

USB: Ultrasonik Su Banyosu Etanol özütü, SK: Su ile Kaynatılmış, SF: Su ile Fermentasyon

Antioksidan özellikler, serbest radikal temizleyicileri, indirgeyici ajanlar ve metal şelasyonu olarak işlev görebilen hidroksil gruplarından dolayı flavonoidlere atfedilir (Agati ve ark. 2012). Serbest radikal süpürücü aktivitenin, örneğin fenolik bileşiminden büyük ölçüde etkilendiği bildirilmiştir (Cheung ve ark. 2003). Bu çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *U. dioica* özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildiğinde kullanılan çözücünün ve metodun önemli farklılık oluşturduğu gözlemlenmiştir (Tablo 3.). Etanolik özütün, su özütlerine nazaran test mikroorganizmaları arasında daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. Gram pozitif bakteriler arasında *E. faecium*'a karşı herhangi bir inhibisyon etki gözlenmezken, en yüksek antimikrobiyal etki Gram negatif organizma olan *E. coli*'ye karşı elde edilmiştir. Klinik izolat mayalardan *C. parapsilosis*'e karşı her üç

bitkinin sahip olduğu fenolik ve flavonoid içeriğinin, özütlerin antioksidan aktivitesinden sorumlu olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak *U. dioica*'nın su ve etanolik özütlerinin güçlü bir doğal antioksidan kaynağı olduğu söylenebilir.

3.3. Antimikrobiyal Aktiviteye ait Sonuçlar

özütün inhibisyon etkisi gözlenirken *C. albicans*'a karşı bir etki görülmemiştir.

Bu sonuçlara benzer olarak Kukrić ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmada, *U. dioica* yapraklarının etanol özütünün, *E. coli*'ye karşı zayıf bir antibakteriyel aktivite göstermiş olduğunu, özütün minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) 9.05 mg/mL olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada ise Hatay bölgesinden toplanan bitki örneklerinden etanolik özütlerin MİK değerlerinin daha düşük konsantrasyonda olduğu gözlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 3. *U. dioica* bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi

Organizma/ Organism	İnhibisyon Zonu (Etanol) (mm)	İnhibisyon Zonu (Su ile kaynatılmış) (mm)	İnhibisyon Zonu (Su ile fermentasyon) (mm)	CXM	Nystatine (NSY)
MRSA*	8	8	7	22	TE
<i>E. faecium</i> *	-	-	-	-	TE
<i>S. lutea</i> ATCC 9341NA	9	8	7	45	TE
<i>E. coli</i> ATCC 309628	15	15	15	18	TE
<i>E. faecalis</i> *	11	9	-	21	TE
<i>S. aureus</i> *	10	9	7	15	TE
<i>C. parapsilosis</i> *	12	13	10	TE	18
<i>C. albicans</i> *	-	-	-	TE	18

Cxm: Cefuroxime sodium (30µg)-Oxoid; Nys: Nystatine 100U; TE: Test edilmedi; *: Klinik izolat

Tablo 4. Tüp dilüsyon metodu ile *U. dioica* özütlerinin MİK değerleri (mg/mL)

Organizma/Organism	MİK (Etanol) (mg/mL)	MİK (Su ile kaynatılmış) (mg/mL)	MİK (Su ile fermentasyon) (mg/mL)
MRSA*	4	2	4
<i>E. faecium</i> *	2	-	2
<i>S. lutea</i> ATCC 9341NA	2	2	4
<i>E. coli</i> ATCC 309628	2	1	1
<i>E. faecalis</i> *	2	2	4
<i>S. aureus</i> *	4	4	4
<i>C. parapsilosis</i> *	4	2	8
<i>C. albicans</i> *	4	8	8

* : Klinik izolat

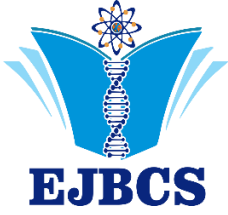
KAYNAKLAR

- Abu-Reidah IM, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. 2013. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chem.* 141: 2269–2277
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. 2012. Flavonoids as antioxidants. In plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 196: 67–76
- Ayan AK, Çalışkan Ö, Çırak C. 2006. Isırganotu (*Urtica* Spp.)'Nun Ekonomik Önemi Ve Tarımı. *Omü Zir. Fak. Dergisi.* 2006. 21(3): 357-363
- Baytop T. 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. Nobel Tıp Yayınevi. 2. Baskı. İstanbul
- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239(1): 70-76
- Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6): 6852-6865
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CLWT. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 28(1): 25-30
- Chang, CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 10(3): 178-182
- Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.* 81: 249–255
- Collins CH, Lyne PM, Grange JM. 1989. Collins and Lyne's Microbiological Methods, Sixth Edition, Butterworths Co. Ltd. London.
- Comlekcioglu N, Kocabaş YZ, Aygan A. 2020. Kahramanmaraş'tan Toplanan *Prunus divaricata* subsp. *Divaricata* Ledeb. Meyvelerinin Biyokimyasal Özellikleri ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *ANADOLU*, 30(1): 46-56, doi: 10.18615/anadolu.
- Davis PH. 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, Edinburgh University Press.
- Dhouibi R, Affes H, Salem MB, Hammami S, Sahnoun Z, Zeghal KM, Ksouda K. 2019. Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Progress in biophysics and molecular biology*, 150: 67-77
- Du M, Ahn DU. 2002. Simultaneous Analysis of Tocopherols, Cholesterol and Phytosterols. Using Gas Chromatography, *J. Food Sci.* 67(5): 1696-1700
- Durak I, Biri H, Devrim E, Sozen S, Avci A. 2004. Aqueous extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. *Cancer Biol Ter.* 3: 855–857
- Đurović, S, Šorgić S, Popov S, Radojković M, Zeković Z. 2018. Isolation and GC Analysis of Fatty Acids: Study Case of Stinging Nettle Leaves. *Carboxylic Acid: Key Role in Life Science.* Badaea, GI, Radu, GL, Eds, 69-83
- Eseceli H, Değirmencioğlu A, Kahraman R. 2006. Omega Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Yönünden Önemi. Türkiye 9. Gıda Kongresi. 24-26 Mayıs, Bolu. 403-406.
- Esposito S, Bianco A, Russo R, Di Maro A, Isernia C. 2019. Pedone P.V. Therapeutic Perspectives of Molecules from *Urtica dioica* Extracts for Cancer Treatment. *Molecules*, 24(15), 2753
- Fattahi S, Ardekani AM, Zabihi E, Abedian Z, Mostafazadeh A, Pourbagher R, Akhavan-Niaki H. 2013. Antioxidant and apoptotic effects of an aqueous extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev.* 14: 5317–5323
- Gul S, Demirci B, Baser KH, Akpulat HA, Aksu, P. 2012. Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Bull Environ Contam Toxicol.* 88: 666–671
- Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- Grauso L, Emrick S, Bonanomi G, Lanzotti V. 2019. Metabolomics of the alimurgic plants *Taraxacum officinale*, *Papaver rhoeas* and *Urtica dioica* by combined NMR and GC-MS analysis Phytochemical Analysis. 30: 535–546
- Hossen I, Hua W, Ting L, Mehmood A, Jingyi S, Duoxia X, Yanping C, Hongqing W, Zhipeng G, Kaiqi Z, Fang Y, Junsong X. 2019. Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* doi: 10.1080/10408398.2019.1570913.
- Huang X, Deng T, Moore MJ, Wang H, Li Z, Lin N, Yusupov Z, Tojibaev KS, Wang Y, Sun H. 2019. Tropical Asian Origin, boreotropical migration and long-distance dispersal in Nettles (*Urticeae*, *Urticaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 137: 190-199.
- Jinous A. 2012. Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica*. *J. Med. Plants Res.* 6: 5714–5719. doi:10.5897/JMPR12.540.
- Kan Y, Orhan İ, Koca U, Özcelik B, Aslan S, Kartal M, Küsmenoglu İ. 2009. Fatty Acid Profile And Antimicrobial Effect Of The Seed Oils Of *Urtica Dioica* And *U. Pilulifera*. *Turk J. Phrm. Sci.* 6(1): 21-30
- Karakaş S. 2003. Isırgan Otu Toprak Altı Ve Toprak Üstü Kısımlarından Isırgan Otu Ekstraktının Eldesi ve Özelliklerinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi. (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Kelley NS, Hubbard NE, Erickson KL. 2007. Conjugated Linoleic Acid Isomers and Cancer. *The J Nutr.* 137: 2599-2607
- Koczka N, Petersz D, Stefanovits-Banyai E. 2012. Total Phenol Content And Antioxidant Capacity (Frap) of *Urtica dioica* L. Leaf Extracts, ISHS Acta Horticulturae 1099: II International Symposium On Horticulture İn Europe. doi:10.17660/ActaHortic.2015.1099.21
- Konrad L, Müller HH, Lenz C, Laubinger H, Aumuller G, Lichius JJ. 2000. Antiproliferative Effect on Human Prostate Cancer Cells by a Stinging Nettle Root (*Urtica dioica*) Extract, *Planta Medica.* 66(1): 44-47.
- Korkmaz F. 2010. Isırgan Otu (*Urtica Dioica*) Ekstresinin Kolon Kanseri Hücre Serileri Üzerindeki Apoptotik, Antiproliferatif Ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Ankara
- Kregiel D, Pawlikowska E, Antolak H. 2018. *Urtica spp.*: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Molecules.* 23: 1664.
- Krystofova O, Adam V, Babula P, Zehnalek J, Beklova LH, Kizek R. 2010. Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7(10): 3804-3815
- Kukric ZZ, Topalic-Trivunovic LN, Kukavica BM, Matos SB, Pavicic SS, Boroja MM, Savic AV. 2012. Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta periodica technologica*, (43): 257-272

- Lewis NM, Seburg S, Flanagan NL. 2000. Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poult. Sci.* 79: 971-974.
- Manganelli REU, Zaccaro L, Tomei PE. 2005. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *J. Ethnopharmacology*, 98: 323-327.
- Martinez-Aledo N, Navas-Carrillo D, Orenes-Pinero E. 2020. Medicinal plants: active compounds, properties and Antiproliferative effects in colorectal cancer. *Phytochemistry Reviews*. pp 1-15.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85(2): 231-237.
- Mohammed FS, Akgul H, Sevindik M, Khaled BMT. 2018. Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. *Fresenius Environmental Bulletin.* 27(8): 5694-5702.
- Mohammed FS, Sevindik M, Bal C, Akgül H, Selamoğlu Z. 2019. Biological Activities of *Adiantum capillus-veneris* Collected from Duhok Province (Iraq). *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology.* 28(2): 128-142.
- Mohammed FS, Şabik AE, Sevindik E, Pehlivan M, Sevindik M. 2020. Determination of Antioxidant and Oxidant Potentials of *Thymbra spicata* Collected from Duhok-Iraq. *TURJAF.* 8(5): 1171-1173.
- Mohammadi A, Mansoori B, Aghapour M, Baradaran PC, Shajari N, Davudian S, Salehi S, Baradaran B. 2016. The herbal medicine *Urtica dioica* inhibits proliferation of colorectal cancer cell line by inducing apoptosis and arrest at the G2/M phase. *J Gastrointest Canc.* 47(2): 187-195.
- Nahata A, Dixit VK. 2012. Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. *Andrologia.* 44(Suppl 1): 396-409, doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01197.x
- Pehlivan M, Sevindik M. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia multicaulis*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology.* 6(5): 628-631.
- Prostate Cancer Fund. 2007. *Treatment Of Prostate Cancer With Natural Therapeutics.* Edition 5, Jan. Washington.
- Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol* vol. 5(11), pp. 1142-1145.
- Rita-Carvalho A, Costa G, Figueirinha A, Liberal J, Prior JA, Lopes MC, Cruz MT, Batista MT. 2017. *Urtica spp.*: phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International.* 99: 485-494
- Rivera-Rangel RD, Gonzalez-Munoz MP, Avila-Rodriguez M, Razo-Lazcano TA, Solans C. 2018. Green synthesis of silver nanoparticles in oil-in-water microemulsion and nano-emulsion using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent. *Colloids Surf A* 536: 60-67
- Rochfort S, Parker AJ, Dunshea FR. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry.* 69: 299-322
- Upton R. 2013. Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *J Herb Med.* 3: 9-38, doi:10.1016/j.hermed.2012.11.001.
- Wang M, Simon JE, Aviles IF, He K, Zheng QY, Tadmor Y. 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.* 51: 601-608

RESEARCH ARTICLE

Eurasian J Bio Chem Sci, 3(Ek 1):213-216, 2020
https://doi.org/10.46239/ejbcsc.820730



Eurasian Journal of
Biological and Chemical Sciences

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



Çinko oksit nanopartikülünün *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae) (L.) larvalarında asetilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Yağmur Meşe¹, Benay Tunçsoy², Pınar Özalp^{3*}

^{1,3*}Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji, Adana
²Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomühendislik, Adana

*Sorumlu Yazar: pozalp@cu.edu.tr

Orcid No: https://orcid.org/0000-0002-2977-6334

Received : 04/11/2020

Accepted : 25/12/2020

Özet: Çinko oksit nanopartikülü (ZnO NP), nanoteknolojinin gelişmesiyle birçok alanda (gıda ve ambalaj katkı maddeleri sanayii, kozmetik, güneş kremleri v.b.) yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik membranlardan rahatlıkla geçebilen nanopartiküller organ, doku, hücre ve moleküler düzeyde olumsuz etkilere ve birikime neden olabilmektedirler. Yapılan çalışmada, *Galleria mellonella* son evre larvalarına arka bacaklarından ZnO NP enjeksiyon yoluyla 30 mg/l ve 30 µg/mL derişimlerinde uygulanmıştır. Uygulama sonunda kontrol ve deneme gruplarından izole edilen yağ dokudaki oksidatif stres düzeyi AChE enzim aktivitesinin tespiti ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, ZnO NP maruz kalan *G. mellonella* larvalarının yağ dokudaki AChE aktivitesinde kontrole göre her iki uygulama grubunda da istatistiki olarak belirgin artış ve azalışlar göstermiştir. Toksikite çalışmaları için basit, ucuz ve hızlı üretilebilen bir model olan *G. mellonella* larvalarının yağ dokusundaki makromoleküllerin olası değişikliklerinin tespit edilmesi ile biyokimyasal etkilerin anlaşılması, çevreye daha az olumsuz etkisi olan yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacağı ve elde edilen veriler doğrultusunda yapılacak immünolojik ve fizyolojik çalışmalara yol gösterebileceği düşünülmektedir

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, Asetilkolinesteraz, Çinko oksit, Nanopartikül

Effects of zinc oxide nanoparticle on acetylcholinesterase enzyme activity in Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae

Abstract: Zinc oxide nanoparticles (ZnO NP) is widely used in many field, food and packaging additives industry, cosmetics, sunscreens etc., with the development of nanotechnology. Nanoparticles can readily pass through biological membranes and so cause negative effects and accumulation at the organ, tissue, cell and molecular level. In this study, 30 mg/l and 30 µg/mL concentrations of ZnO NP were injected into the first proleg of the last instar *Galleria mellonella* larvae. Then, the antioxidant stress level in fat body isolated from the control and application groups was determined by determining the AChE enzyme activity. As a result of the data obtained, AChE activity in fat body of *G. mellonella* larvae exposed to ZnO NP showed statistically significant increases and decreases in both groups compared to control. It have shown that, understanding the biochemical effects and determine to the possible changes of macromolecules in fat body of *G.mellonella* larvae, which is a simple, inexpensive and fast to produce model for toxicity studies, will help develop methods that have less adverse effects on the environment and lead to immunological and physiological studies.

Keywords: *Galleria mellonella*, Acetylcholinesterase, Zinc oxide, Nanoparticle

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Nanoteknolojinin hızlı gelişim göstermesi sonucu çeşitli boyut ve çaplardaki nanomateryaller ticari ve endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Nanomateryaller, yüzey alanlarının geniş olması ve yüksek reaksiyon

aktiviteleri ile son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Nanopartiküller yüksek yüzey-hacim oranı, elektronik yapı, yüksek reaksiyon aktiviteleri gibi belirgin derecede farklı fizikokimyasal özelliklere ve boyutlara sahip 100 nm'den küçük bileşiklerdir. (Portakal 2008). Metal oksit nanopartikülleri, cam ve boya sanayinde, cilalamada,

elektronik eşya üretiminde, ilaç ve gıda katkı maddelerinde, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde, biyoteknoloji ve tıp alanında görüntüleme sıklıkla kullanılmaktadır. Çinko oksit nanopartikülü (ZnO NP) boya, diş macunu, güneş kremleri, pillerde, antibakteriyel, gıda sanayisi ve ambalaj paketlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Jun ve ark. 2013; Kim ve ark. 2017; Du ve ark. 2018; Keerthana ve Kumar 2020). Nanomateriyallerin birçok alanda kullanılması ve uygulanması, çevre ile etkileşiminin büyük ölçüde artmasına yol açmaktadır. Biyolojik membranlardan rahatlıkla geçebilen nanopartiküller organ, doku, hücre ve moleküler düzeyde olumsuz etkilere ve birikime neden olabilmektedir. Eser element olarak çinko (Zn) canlılığın devamı, çoğalması ve immün sistemin faaliyetlerinin sürdürülmesi için gereklidir. Zn metalloenzim ve proteinlerin kofaktörü ve birçok DNA-bağlayıcı proteinin çinko basamaklarında çok çeşitli enzimlerde aktif bölgeler oluşturan kritik bir elementtir (Dow 2017). Ayrıca immün sistem hücreleri ile önemli bileşimler arasında ara bulucu rol oynamaktadır (Weiss ve Carver 2018). Aynı zamanda belirli konsantrasyonlarda serbest radikal oluşumunu indükleyerek oksidatif strese neden olabilmektedir. Zhao ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada ZnO NP' nin *Danio rerio* embriyolarında oksidatif stres ve DNA hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Oksidatif stres; reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve bozulması arasındaki dengesizliğe dayanan fizyolojik ya da patofizyolojik süreç olarak tanımlanmaktadır (Staerck ve ark. 2017). ROT hücreler makro moleküllere saldırarak proteinlerin oksidasyonuna, nükleik asitlerin zarar görmesine, lipid peroksidasyonuna ve hücre savunma sistemlerinin aktive olmasına neden olmaktadır (Hermes-Lima ve Zenteno-Savin 2002; Gavrilovic ve ark. 2017). Detoksifikasyon enzimleri genellikle ksenobiyotiklere karşı enzimatik savunma olarak gösterilmektedir ve normal fizyolojik fonksiyonlarının devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Tunçsoy 2018). Asetilkolinesteraz (AChE), Sitokrom P450 (CytP450) ve glutatyon-s-transferaz (GST) organizmalarda ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu enzimlerdir. Bu gibi enzimlerin artışları ksenobiyotiklerin ve/veya kontaminantların toksik etkisinin belirlenmesinde biyomarkır olarak kullanılmaktadır. AChE, hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda, başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferel birçok dokuda yaygın olarak bulunan nöronal bir enzimdir. (Tunçsoy 2017). AChE'nin ana işlevi, nörotransmitter asetilkolini (ACh) hidroliz ederek nörotransmisyonu düzenlemektir (Kim 2017). ACh sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci bir sinir hücresine, sinir implusu taşıma görevini yapmaktadır. Sinapsislerdeki artan ACh konsantrasyonu ve daha fazla uyarılmış merkezi sinir sistemi böceklerde ülüme yol açmaktadır (Yorulmaz 2009). Yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlarda uygulanan ZnO NP'nin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Toksikite çalışmaları için basit, ucuz ve hızlı üretilebilen bir model olan *G. mellonella* larvalarının yağ dokusundaki

makromoleküllerin olası değişikliklerinin tespit edilmesi ile biyokimyasal etkilerin anlaşılması, çevreye daha az olumsuz etkisi olan yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacağı ve elde edilen veriler doğrultusunda yapılacak immünolojik ve fizyolojik çalışmalara yol gösterebileceği düşünülmektedir.

2. Materyal ve Metod

G. mellonella L. larvaları, laboratuvar ortamında kitle üretimi yapılan $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve $\%70 \pm 5$ bağıl neme sahip ortam koşullarında Bronksill (1961) tarafından belirlenmiş olan yarı sentetik besin ile beslenen stok kültüründen elde edilmiştir. *G. mellonella* son evre larvalarına arka bacaklarından ZnO NP enjeksiyon yoluyla $30 \mu\text{g/L}$ ve 30 mg/L derişimlerinde uygulanmıştır. Uygulama sonunda larvalar sırt kısmı strafora gelecek şekilde sabitlenerek birinci çift arka bacaklarının önünden orta eksen boyunca alkol ile dezenfekte edilmiş mikro makas ile kesilerek larvaların yağ dokusu alınmıştır. Daha sonra eppendorf tüplere alınan yağ doku örneklerinin üzerine 1:5 oranında Tris HCl (100 mM, pH: 8.0) çözeltisi eklenmiştir. Tris HCl solüsyonun miktarının 10 katı hacminde $\%10$ Triton karışıma ilave edilmiştir. Örnekler 2 dk. homojenize edilmiş ve toplam homojenat $12000 \text{ g}'$ de $+4^\circ\text{C}'$ de 30 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen supernatantın bir kısmı total protein tayini için, kalan kısmı ise AChE aktivitesinin belirlenmesi için $-80^\circ\text{C}'$ de derin dondurucuda saklanmıştır. AChE aktivitesi Ellman ve ark. (1961), total protein tayini ise Bradford (1976) tarafından belirlenen metoda göre analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler kontrol ve deney grupları arasındaki istatistiksel veriler SPSS 21.0 bilgisayar programında SNK testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

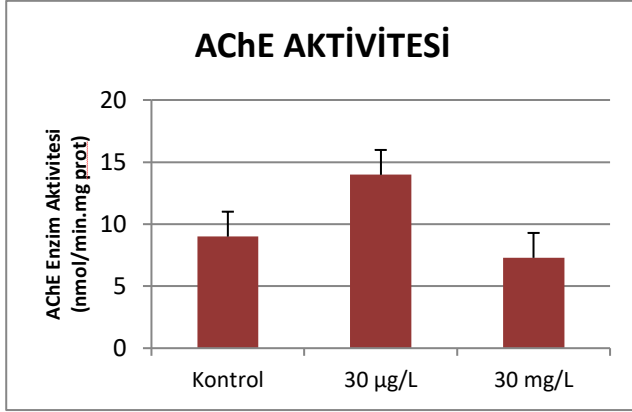
3. Bulgular

Tablo 1'de *G. mellonella* larvalarının kontrol ve ZnO NP ($30 \mu\text{g/L}$, 30 mg/L) uygulamasının yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi gösterilmiştir. *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesinde kontrole göre her iki uygulama grubunda da istatistiki olarak farklılıklar görülmüştür. (Şekil 1)

Tablo 1: Farklı derişimlerdeki ZnO NP'nin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi üzerine etkileri

DERİŞİM	AChE AKTİVİTESİ (U/dk/mg protein)
Kontrol	8,993±0,158 a
30 µg/L	13,970±0,254b
30 mg/L	7,281±0,034 c

*SNK; Küçük harfler uygulama ve kontrol arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Aynı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiki fark yoktur ($P < 0.05$).



Şekil 1: Farklı derişimlerdeki ZnO NP'nin *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

4. Tartışma

ACh sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci bir sinir hücreğine, sinir implusu taşıma görevini yapmaktadır. AChE'nin ana işlevi, nörotransmitter ACh'yi hidroliz ederek nörotransmisyonu düzenlemektir (Kim 2017). *Apis mellifera* ile yapılan çalışmada ZnO NP'nin böceğin AChE enzim aktivitesinde önemli derecede artışa, beyin ve protein içeriğinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Milivojevi ve ark. 2015). *Spodoptera littoralis* ile yapılan bir çalışmada ZnO NP'nin enzim aktivitelerinde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir (Ibrahim ve Ali 2018). *Schistocerca gregaria* nimfleri ile yapılan bir çalışmada abamectin uygulaması sonucunda AChE aktivitesinde artış meydana gelirken, *Spodoptera litura* larvalarındaki enzim aktivitesinde önemli bir değişim olmadığı bildirilmiştir (Abd El-Aziz 2010, 2015).

Yapılan bu çalışmada 30 µg/L grubunda AChE aktivitesi kontrole göre %62,5 oranında belirgin bir artış göstermiştir (Şekil 1). *G. mellonella* ile yapılan başka bir çalışmada sodyum tetraboratın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda, hemolenfte AChE aktivitesinde azalma meydana geldiği, yağ dokuda ise artış olduğu tespit edilmiştir (Durmuş 2007). Oksidatif stresin yani serbest radikallerin artması ile ACh salınımında bir artış olmuş ve bu nedenle de AChE aktivitesinin artmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin etkileri, konsantrasyona, dokuya ve süreye bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

Böceklerin toksik maddeler ile reaksiyonları hızlı ve güçlüdür. Yapılan çalışmalarda toksik metallerin bu tür böcekler üzerindeki büyüme inhibisyonu, gelişim bozuklukları, mortalitesi, fizyolojilerinin yeniden düzenlenmesi, biyokimyası vb. akut ve kronik etkiler sıklıkla bildirilmektedir (Peric-Mataruga ve ark. 2019). Metallerin dokuda birikmesi, yüksek süperoksit radikallerinin veya hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi türevlerin oluşumunu artırır (Gopi ve ark. 2019). Yapılan çalışmalarda ZnO NP'nin dokularda biriktiği ve apoptozise neden olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda 30 mg/L derişiminde uygulanan grupta kontrole göre %12,5 oranında bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 1). ZnO NP'nin toksisitesi sonucunda serbest radikallerin artması ve artan

radikallerin AChE aktivitesini azaltmasıyla enzim aktivitesi inhibe olmuş olabilir. Başka bir yorum artan serbest radikallerin, enzimlerin kofaktörü olan Zn iyonları ya da enzim yapısındaki aminoasitler ile etkileşerek enzimlerin aktivitesini azaltmış olabilir. Sinapsislerdeki AChE organizmalarda ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu enzimlerden biridir. Ksenobiyotikler AChE'ye bağlanır, ACh hidroliz edilmesine rağmen ksenobiyotikler enzim-substrat kompleksi olarak sabit kalır ve AChE enzimi bloke edilerek ACh resöptörlerinin uyuşması sağlanır. Detoksifikasyon enzimleri genellikle ksenobiyotiklere karşı enzimatik savunma olarak gösterilmekte ve normal fizyolojik fonksiyonların devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Tunçsoy 2018). Bu gibi enzimlerin artışları ve/veya azalışları ksenobiyotiklerin toksik etkisinin belirlenmesinde biyomarkör olarak kullanılmaktadır.

5. Sonuç

Yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlardaki ZnO NP'nin in vitro koşullarda biyoindikatör bir tür olan *G. mellonella*'nın yağ dokusundaki AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak organizmaya farklı konsantrasyonlarda uygulanan ZnO nanopartiküllerinin, canlıda oksidatif strese neden olduğu ve AChE enzim aktivitesini etkilediği görülmüştür. Dünya nüfusunun büyük bir kısmını oluşturan böcekler doğada çok yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Nanopartiküllere hava, su, oral yollarla maruz kalabilen böcekler, çevre kirliliği düzeylerinin belirlenmesinde biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yaşam döngülerinin kısa olması ve hızlı üremelerinden dolayı laboratuvar ortamında kolay üretilmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı da insan akut toksisite, bakteriyel ve fungal patojenite, antimikrobiyal farmakinetik etkilerinin araştırılması çalışmalarında omurgalılara alternatif olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Omurgalılara benzer immün sistem tepkileri gösteren model organizma ve biyoindikatör bir tür olan *G. mellonella*'nın, böcek fizyolojisinde önemli bir parametre olan detoksifikasyon sistemlerinin ZnO NP'ye verdiği tepkilerin anlaşılması ileride yapılacak toksikolojik, genotoksik, fizyolojik ve ekotoksikolojik çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

Yapılan çalışma, Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FBA/2020/12547). Aynı zamanda bu çalışma, Gaziantep'te gerçekleştirilen 2nd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2020) kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-54

- Bronksill JF. 1961. A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria Mellonella* (Pyralidae). J Lep Soc. 102-4
- Dow JAT. 2017. The Essential Roles of Metal Ions in Insect Homeostasis and Physiology. *Curr Opin Insect Sci.* 23:43-50
- Du J, Tang J, Xu S, Ge J, Dong Y, Li H, Jin M. 2018. ZnO nanoparticles: recent advances in ecotoxicity and risk assessment. *Drug Chem Toxicol.* doi:10.1080/01480545.2018.1508218
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol.* 7:88-95
- Gavrilović A. 2017. Effects of Benzo[a]Pyrene Dietary Intake to Antioxidative Enzymes of *Lymantria Dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Larvae from Unpolluted and Polluted Forests. *Chemosphere.* 179: 10-19
- Gopi N, Vijayakumara S, Thaya R, Govindarajan M, Alharbi N, Kadaikunnan S, Khaled J, Al-Anbr M, Vaseeharan B. 2019. Chronic exposure of *Oreochromis niloticus* to sub-lethal copper concentrations: Effects on growth, antioxidant, non-enzymatic antioxidant, oxidative stress and non-specific immune Responses. *J Trace Elem Med Bio* 55:170-179
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T. 2002. Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 133(4): 537-556
- Ibrahim AMA, Ali MA. 2018. Silver and Zinc Oxide Nanoparticles Induce Developmental and Physiological Changes in the Larval and Pupal Stages of *Spodoptera Littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Asia-Pac Entomol.* 21(4): 1373-1378
- Jun X, Zhou ZH, Hua LG. 2013. Effects of Selected Metal Oxide Nanoparticles on Multiple Biomarkers in *Carassius auratus*. *Biomed Environ Sci.* 26(9): 742-749
- Keerthana S, Kumar A. 2020. Potential risks and benefits of zinc oxide nanoparticles: a systematic review. doi:10.1080/10408444.2020.1726282
- Kyu-Bong K, Kim YW, Lim SK, Roh TH, Bang DY, Choi SM, Lim Y, Kim YJ, Baek S-H, Kim M-K, Seo H-S, Kim M-H, Kim HS, Lee JY, Kacew S, Lee B-M. 2017. Risk assessment of zinc oxide, a cosmetic ingredient used as a UV filter of sunscreens. *Jpn J Tox Env Health.* 20(3):155-182
- Milivojević T, Glavan G, Božić J, Sepčić K, Mesarić T, Drobne D. 2015. Neurotoxic potential of ingested ZnO nanomaterials on bees. *Chemosphere.* 120:547-554
- Perić-Mataruga V. 2019. Parameters of Oxidative Stress, Cholinesterase Activity, Cd Bioaccumulation in the Brain and Midgut of *Lymantria Dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Caterpillars from Unpolluted and Polluted Forests. *Chemosphere.* 218: 416-24.
- Portakal O. 2008. Bioassays and Nanoparticles. *Turk J Biochem.* 33 (1):35-38
- Tunçsoy B. 2017. Pyriproxyfen ve *Bacillus thuringiensis* 'in *Galleria mellonella* L.' nin Oksidatif stres Düzeyi, Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemi ve Hemosit Sayılarına Etkileri. Adana, Türkiye.
- Tunçsoy B, Tunçsoy M, Gomes T, Sousa V, Teixeira RM, Bebianno MJ, Ozalp P. 2018. Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Tissue Accumulation and Antioxidant Enzymes of *Galleria mellonella* L.. *B Environ Contam. Tox.* doi:10.1007/s00128-018-2529-8
- Weiss G, Carver PL. 2018. Role of Divalent Metals in Infectious Disease Susceptibility and Outcome. *Clin Microbiol Infect.* 24(1): 16-23



EJBCS