



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***CANAKKALE ONSEKİZ MART UNIVERSITY  
JOURNAL OF ADVANCED  
RESEARCH IN NATURAL AND  
APPLIED SCIENCES***



ISSN 2757-5195

**Journal of Advanced Research in Natural  
and Applied Sciences**

**e-ISSN: 2757-5195**

**Volume 7 / Issue 3**

**Sayı 7 / Cilt 3**

**2021-Eylül/September**

**Yayıncı/Publisher:** Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

**Rektör /Rector:** Prof. Dr. Sedat MURAT

**Dergi Editör Kurulu /Editorial Board**

Doç.Dr. Filiz UĞUR NİGİZ (Editor-in-Chief)

Dr. Öğretim Üyesi Ayça AYDOĞDU

Dr. Tuğba GÜNGÖR

Doç.Dr. Deniz ŞANLIYÜKSEL YÜCEL

Doç.Dr. Necati KAYA

Dr. Öğretim Üyesi Gülçin ÖZCAN ATEŞ

Dr. Öğretim Üyesi Şebnem ÖNDER

Dr. Öğretim Üyesi Doğukan TAŞER

**Sekreteryası/Secretary**

Arş. Gör. Sinem ALTINIŞIK

## **Önsöz:**

Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences Dergisi Fen, Mühendislik, Doğa ve Temel bilimler alanlarında daha önce yayımlanmamış orijinal araştırma makalesi, derleme yazılar, teknik not türünde araştırmaları yayınlayan ulusal ve uluslararası indekslerde taranan, hakemli ve bilimsel bir dergidir. Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences Dergisi Mart, Haziran, Eylül, Aralık olmak üzere yılda dört sayı yayınlanacaktır. Tr-Dizin’de taranan Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences Dergisi’nin 7.cilt 3.sayısında 11 adet araştırma makalesi ve 1 adet derleme yayına kabul edilmiştir.

	<ul style="list-style-type: none"><li>• TÜBİTAK TR DİZİN tarafından taranmaktadır</li><li>• Indexed by TR-DİZİN Database.</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• TÜBİTAK-ULAKBİM DergiPark Akademik tarafından yayımlanmaktadır.</li><li>• Published by TÜBİTAK-ULAKBİM Turkish Journal Park Academic Database.</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• CROSSREF® Veri Tabanı Tarafından Taranmakta ve Makaleler DOI numarası ile yayımlanmaktadır.</li><li>• Indexed by CROSSREF® Database and Articles are published with DOI number.</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Google Scholar'da ve SOBIAD'da taranmaktadır</li><li>• Indexed by Google Scholar and SOBIAD Database.</li></ul>

İletişim Adresi / Publisher Address: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Terzioğlu Yerleşkesi Çanakkale (Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Binası)

Tel: 0286 218 05 23, Belgegeçer / Fax: 0286 218 05 24

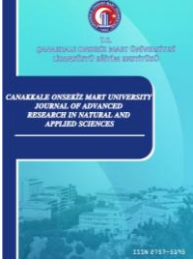
E-posta / E-mail: [jarnas.journal@gmail.com](mailto:jarnas.journal@gmail.com)

Dergi Web Sayfası / Journal Home Page:

<http://jarna.dergi.comu.edu.tr/>

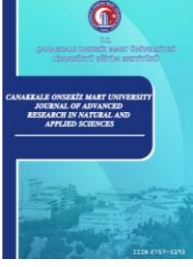
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/jarnas>





**CONTENTS / İÇİNDEKİLER**  
(2021, 7:3)

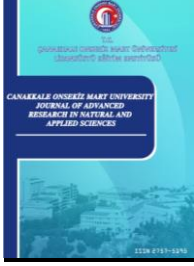
No	Articles & Authors / Makaleler & Yazarlar	Pages / Sayfa No
1	CM SAF Oransal Bulut Kapalılığı (CFC) Verisinin Başarımı ve Doğu Anadolu Gözlemevi (DAG) Yerleşkesi için Analizi Kazım KABA*, Cahit YEŞİLYAPRAK <b>Research/Araştırma</b>	304 - 318
2	Edirne İlinde Yetişen Dut Ağacı Yapraklarının Antioksidan ve Antidiyabetik Aktivitesi Üzerine Bir Çalışma Şebnem Selen İŞBİLİR*, Eren ÇELİK <b>Research/Araştırma</b>	319 - 332
3	Effect of Vitamin C on Cadmium Depending Growth and Vitamin C Contents of Citrobacter Freundii Muhammad Salihu İBRAHİM, Meltem ÇAKMAK, Dursun ÖZER, Fikret KARATAŞ*, Sinan SAYDAM <b>Research/Araştırma</b>	333 - 342
4	Assessment of Quality and Aroma Characteristics of Kefir Produced by Using Grain and Lyophilized Culture İrem ŞEN DAĞ, Buket AYDENİZ GÜNEŞER, Yonca KARAGÜL YÜCEER* <b>Research/Araştırma</b>	343 - 357
5	Boundary Extraction Based on Dual Stream Deep Learning Model in High Resolution Remote Sensing Images Özgün AKÇAY*, Ahmet Cumhuri KINACI, Emin Özgür AVŞAR, Umut AYDAR <b>Research/Araştırma</b>	358 - 368
6	Comparative Retrotransposon Analysis in Wheat Seray ALTINTAŞ, Bekir Ahmet İLGAR, Elif KARLIK* <b>Research/Araştırma</b>	369 - 374



Çanakkale Onsekiz Mart University Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences

Eylül (September) 2021 / Cilt (Volume) 7 / Sayı (Issue) 3 / e-ISSN 2757-5195

7	Morphometric and Morphotectonic characteristics of Sürgü and Çardak Faults (East Anatolian Fault Zone) Musa BALKAYA*, Süha ÖZDEN, Hüsnü Serdar AKYÜZ <b>Research/Araştırma</b>	375 - 392
8	Kavak Çayı (Gelibolu, Çanakkale) Mollusca Faunası ve Bazı Su Kalitesi Özelliklerinin Belirlenmesi Demet BAL, Deniz Anıl ODABAŞI*, Ayтуğ ZİLİFLİ <b>Research/Araştırma</b>	393 - 407
9	Gelibolu Yarımadası Savaş Arkeojeofiziği Çalışmaları: Şahindere Şehitliği ve Lone Pine Anıtı Örnek Bölgeleri Cahit Çağlar YALÇINER*, Yunus Can KURBAN, Erdem GÜNDOĞDU, Mehmet Ali YÜCEL <b>Research/Araştırma</b>	408 - 422
10	Characterization of Asbestos in Ambient Air During Refractory Material Production from Magnesite Ore Mehmet Ali KÜÇÜKER* <b>Research/Araştırma</b>	423 - 436
11	Mısırdaki Toplam Fenolik ve Antosiyanin İçeriğinin Belirlenmesi için Geliştirilmiş NIRS (Yakın Kızıl Ötesi Spektroskopisi) Kalibrasyon Modelleri Üzerine Kemometrik Yöntemlerin Etkisi Mehmet ŞERMENT*, Fatih KAHRIMAN <b>Research/Araştırma</b>	437 - 449
12	Hipoksi ve Kanser Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU*, Fatma POYRAZLI, Derya OKUYAN, Feray KÖÇKAR <b>Review/Derleme</b>	450 - 463



## CM SAF Oransal Bulut Kapalılığı (CFC) Verisinin Başarımı ve Doğu Anadolu Gözlemevi (DAG) Yerleşkesi için Analizi

Kazım Kaba<sup>1,\*</sup>, Cahit Yeşilyaprak<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Astrofizik Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATASAM), Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup>Astronomi ve Uzak Bilimleri, Fen Fakültesi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye

### Makale Tarihçesi

Gönderim: 01.02.2021

Kabul: 11.06.2021

Yayın: 20.09.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** – Doğu Anadolu Gözlemevi (DAG) projesi 2011 yılında Erzurum’da başlatılmıştır. DAG’da 2021 yılı sonunda ilk ışığın alınmasıyla Türkiye’nin en büyük (4 m) optik ve ilk kızılötesi teleskobunun kurulum sürecini tamamlaması planlanmaktadır. Yer tabanlı astronomik gözlemleri için bulutluluk en hayati atmosferik parametredir. Bulutluluk oranı, bulut türleri ve bulut değişimi yer tabanlı bir gözleminde astronomik gözlemlerin yapılmasını kısıtlayabilir veya tamamen engelleyebilir. Bu nedenle bu çalışma DAG yerleşkesinin bulutluluk değerlerine odaklanmıştır. Bu kapsamda DAG yerleşkesi için bulutluluk değerleri analiz edilerek yerleşkenin yıllık açık gün sayıları belirlenmiştir. Bu amaç için çalışmamızda sabit yörüngeli meteorolojik uydu olan ve Türkiye’yi de kapsayan METEOSAT uydu verileri kullanılmıştır. EUMETSAT’ın (European Organisation for the Exploitation of Meteorological Satellites; Avrupa Birliği Meteorolojik Uydu İşletme Teşkilatı) denetim ve koordinasyonunda olan CM SAF (Satellite Application Facility on Climate Monitoring; İklim Yönetimi Üzerine Uydu Uygulama Birimi), METEOSAT verilerinden iklimsel çalışmalar için atmosferimize ait çeşitli veri setleri üretmektedir. Bu verilerden biri olan ve 1991 - 2015 yılları arasında kapsayan CFC (Cloud Fractional Cover; Oransal Bulut Kapalılığı) verisinin öncelikle Türkiye için tutarlılık testi yapılarak ürünün başarımı araştırılmıştır. Test sonuçları bu ürünün tutarlılığının bazı kentlerimiz (Adana, Ankara ve Erzurum) için nispeten düşük kaldığını göstermiştir. Sonraki aşamada DAG için CFC verisinden saatlik, günlük, aylık, mevsimlik ve yıllık bulutluluk analizleri yapılarak DAG yerleşkesinin açık gün sayısı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler** – Astronomi, bulutluluk, CFC, doğu anadolu gözlemevi, meteosat, uzaktan algılama

## Validation of CM SAF Cloud Fractional Cover (CFC) Data and Analysis of CM SAF CFC Data for the Eastern Anatolia Observatory (DAG) Site

<sup>1</sup>Astrophysics Research and Application Center (ATASAM), Atatürk University, Erzurum Turkey

<sup>2</sup>Department of Astronomy and Space Sciences, Science Faculty, Atatürk University, Erzurum, Turkey

### Article History

Received: 01.02.2021

Accepted: 11.06.2021

Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** – Eastern Anatolia Observatory (DAG) project was initiated in Erzurum in 2011. Turkey’s largest (4 m) and the first infrared telescope is planned to complete its installation process by taking its first light at the end of 2021 at DAG. This study was focused on the atmospheric properties of the DAG site in terms of cloudiness known to be the most vital atmospheric parameter for ground-based astronomical observatories. For ground-based astronomical observatories, cloud cover is vital atmospheric parameter. For this reason, this study focused on the cloudiness values for the DAG site. In this regard, cloud coverage values for the DAG site were analysed and the annual numbers of nights convenient for observation at the site were determined. For this purpose, data from METEOSAT, which is a meteorological satellite on a geostationary orbit with full sky coverage over Turkey, was used in the study. The CM SAF (Satellite Application Facility on Climate Monitoring) under the supervision and coordination of EUMETSAT (European Organization for the Exploitation of Meteorological Satellites) produces various data sets of the earth atmosphere for climatic studies from METEOSAT images. CFC (Cloud Fractional Cover) product, which is one of these data sets covering 1991 - 2015, was first tested for consistency for Turkey and the success of the product in representing cloud coverage was investigated. Validation results showed that the success of this product remained relatively low for some cities such as Adana, Ankara and Erzurum. In the next stage, hourly, daily, monthly, seasonal and annual cloudiness analyses were performed for the DAG site from the CFC data, and the number of nights convenient for observations at the DAG site was determined from this data.

**Keywords** – Astronomy, cloud cover, CFC, eastern anatolia observatory, meteosat, remote sensing

<sup>1</sup> kkaba46@gmail.com

<sup>2</sup> cahity@atauni.edu.tr

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Yeryüzü tabanlı astronomik gözlemler için en belirleyici etken yıldızlardan gelen ışığın saçılmasına ve soğurulmasına neden olarak ışığın teleskopa ulaşımını kısıtlayan veya engelleyen Dünya'nın atmosferidir. Atmosferin karakteristik özelliklerinin yüksek doğrulukta tespiti ve sürekli takibi; gözlem yöntemlerinin, projelerinin, aygıtların planlanması, hazırlanması ve kaliteli gözlemsel veriler elde edilmesi için çok önemlidir. Atmosfer, bir gözlemevinin değerli gözlem zamanının etkin bir şekilde kullanılması için de kritik öneme sahiptir. Yeryüzü atmosferi meteorolojik olarak bulutluluk, sıcaklık, yağış, basınç, nem ve rüzgâr gibi temel parametrelerle değerlendirilmektedir. Astronomik gözlemler için ilk temel meteorolojik parametre bulutluluk olup bulutluluk oranı, bulut türleri ve bulutluluk değişimi gibi bilgiler gözlemler için çok önemlidir. Bir gözlemevi için bulutluluk bilgileri hem gözlemevi için seçilen yerleşkenin kalitesini ve ne sıklıkta gözlem yapılabileceği bilgisini verir, hem de yapılacak gözlemlerin türünü ve kullanılacak gözlemsel aygıtların önceden hazırlanması için büyük bir fırsat sağlar.

Günümüzde ülkelerin meteoroloji birimleri yerinde ölçümler, uydu gözlemleri ve radar kayıtları gibi çeşitli araçlarla farklı disiplinlerin (ziraat, ulaşım, astronomi gibi) ihtiyacı olan atmosferik ve meteorolojik verilerin ölçümünü, takibini, yönetimini ve dağıtımını yapmaktadır. Meteoroloji servislerinin yanı sıra çeşitli kurum ve kuruluşlarda (gözlemevleri, kent yönetimleri ve tarım işletmeleri gibi) kendi meteorolojik istasyonlarını kurarak ihtiyaç duydukları bilgilere ulaşmaktadır. Bu farklı yöntemlerle elde edilen atmosferik verilerden biri de bulutluluk bilgileridir. Geleneksel olarak, meteorolojik yer istasyonlarında bulutluluk bilgisi, gözlemciler (rasatçılar) tarafından yüzdesel olarak belirlenirken; son dönemlerde yine yeryüzü tabanlı olarak geniş açılı kameralar (ASC: All Sky Camera) ile gökyüzünün görüntüsü alınarak ve bu görüntülere çeşitli analizler yapılarak bulutluluk bilgileri elde edilmektedir. Diğer bir bulutluluk ölçüm yöntemi ise Dünya çevresinde belirli yörüngelerde bulunan meteoroloji uydularından uzaktan algılama yöntemiyle elde edilen bulutluluk bilgileridir. Ayrıca, sayısal hava tahmin modellerinden de geleceğe ait bulutluluk bilgisi elde edilmektedir. Bulutluluk bilgilerine ait kategorik ve sürekli değerler olmak üzere, bulut maskesi (CMA: Cloud Mask), bulut tipi (CT: Cloud Type) ve bulut oranı (CF: Cloud Fraction) bilgileri elde edilerek; enerji, ulaşım, iklim değişikliği ve astronomi gibi farklı disiplinlere ait çalışmalarda kullanılmaktadır ([Badescu ve Dumitrescu, 2016](#); [Chernokulsky ve Esau, 2019](#); [Hellemeier vd., 2019](#); [Kotarba vd., 2019](#)).

Bulutlar öncelikle gezegenimizde canlılığın devamı için gerekli olan yağış oluşumuna imkân sunarken, yeryüzüne ulaşan kısa dalga enerji ve uzaya kaçan uzun dalga enerji miktarına da etki ederek Dünyanın enerji dengesinde önemli bir rol oynar. Bu olgular gibi bulutların çok önemli görevleri olmakla birlikte kara, deniz ve hava olmak üzere ulaşım ve görüş mesafesine olumsuz etki edebilir. Bunun dışında astronomi açısından baktığımızda astronomik gözlemlerin yapılıp yapılamayacağını ve gözlem yapıldığı takdirde gözlem aşamasında kullanılacak cihaz ile yöntemleri ve elde edilen gözlem verilerinin kalitesini bulutluluk oranı ve bulut tipleri olumsuz etkileyebilir.

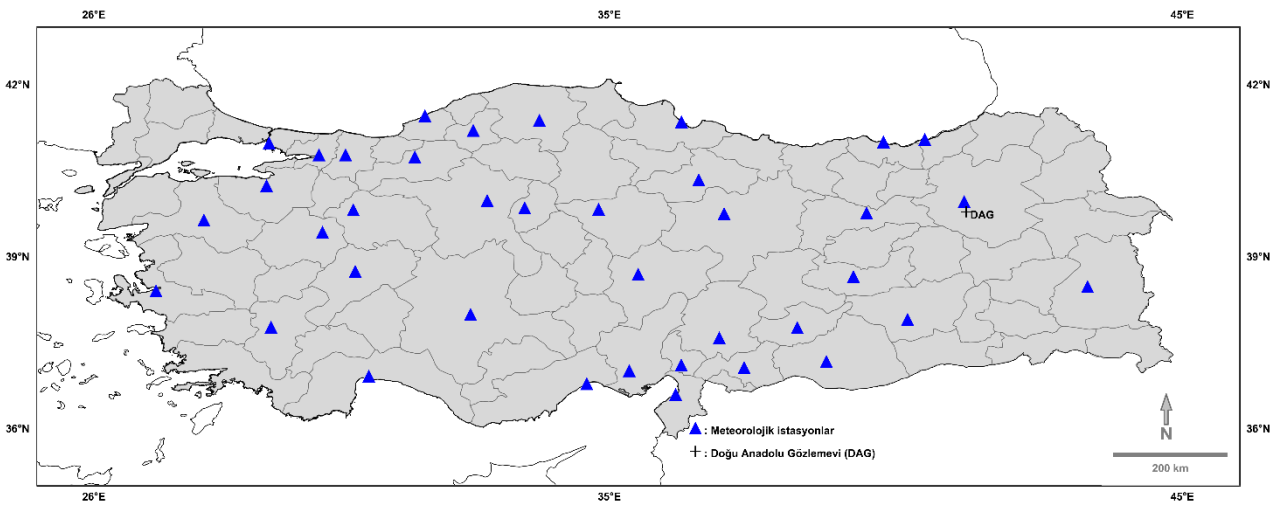
Astronomide, özellikle gözlemevi yer seçimi ile gözlemlerin planlanması ve değerli gözlem zamanının en etkin şekilde kullanılması adına, kısa ve uzun dönemli atmosferik koşulların anlık ve sürekli takibi için meteorolojik veriler yaygın olarak kullanılmaktadır. Gözlemevlerinin kuruluşu için yer seçimi aşamasında ve kurulduktan sonra yerleşkede gözlem yapılabilecek açık gün sayısını belirlemek için başta bulutluluk bilgileri değerlendirilmektedir ([Aksaker vd., 2015](#); [Aksaker vd., 2020](#); [Calisse vd., 2004](#); [Falvey ve Rojo, 2016](#); [Hellemeier vd., 2019](#); [Hidayat vd., 2012](#); [Koc-San vd., 2013](#); [McInnes ve Walker, 1974](#); [Schöck vd., 2009](#); [Vernin vd., 2011](#)). Gözlemevleri için atmosferik ve astronomik koşulların anlık ve sürekli takibi ile ileriye dönük tahminler, uzaktan algılama yöntemleri ve analizleriyle çok daha fazla doğrulukta yapılmaya başlanmıştır. Bu tür çalışmalar, benzer şekildeki bütün büyük gözlemevleri için günümüzde vazgeçilmez hale gelmiştir. Uzaktan algılama verileri, sayısal olmaları, geniş alanları kapsamaları ve düşük maliyetleri nedeniyle pek çok avantaja sahiptir. Uzaktan algılama verileri içerisinde bulut verisi ilk üretilen ürünlerden biri olmasının yanı sıra iyi belirlenmesi de önemli bir avantajdır.

Bu çalışmada Doğu Anadolu Gözlemevi (DAG) için bulutluluk değerleri analiz edilerek açık gün sayıları belirlenmiştir. Bu amaç için çalışmamızda sabit yörüngeli meteorolojik uydu olan ve Türkiye'yi de kapsayan METEOSAT uydu verileri kullanılmıştır. EUMETSAT'ın (European Organisation for the Exploitation of Meteorological Satellites; Avrupa Birliği Meteorolojik Uydu İşletme Teşkilatı) denetim ve koordinasyonunda olan CM SAF (Satellite Application Facility on Climate Monitoring; İklim Yönetimi Üzerine Uydu Uygulama Birimi), METEOSAT verilerinden iklimsel çalışmalar için atmosferimize ait çeşitli veri setleri üretmektedir. Bu verilerden biri olan ve 1991 - 2015 yılları arasında kapsayan CFC (Cloud Fractional Cover; Oransal Bulut Kapalılığı) verisinin (Stöckli vd., 2017) öncelikle Türkiye için tutarlılık testi yapılarak ürünün başarımı araştırılmıştır. Sonraki aşamada DAG için CFC verisinden saatlik, günlük, aylık, mevsimlik ve yıllık bulutluluk analizleri yapılarak bu veriden DAG yerleşkesinin açık gün sayısı belirlenmiştir. Ayrıca CFC verisinden tüm Türkiye'yi kapsayacak şekilde uzun yıllık ortalama bulut atlası elde edilmiştir. Bölgemiz için CM SAF CFC verisinin tutarlılığının araştırılması ve astronomik amaçlı kullanımı ilk olup bu ürün ile DAG bulutluluk bilgileri ve karakteristik özellikleri ilk kez bu çalışma ile sunulmuştur.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada CM SAF tarafından geliştirilen CFC verisinin başarımını Türkiye için test etmek üzere Doğu Anadolu Gözlemevi (DAG) için bulutluluk değerleri CFC verisinden analiz edilmiştir. CFC verisinin doğruluğunu test etmek için hem MGM yer ölçümü hem de uydu ölçümünün günlük ortalama bulutluluk değerleri kullanılmıştır. MGM istasyonlarında (klima) 07, 14 ve 21 yerel saatlerinde yapılan bulut ölçümlerinden elde edilen günlük ortalama bulut değerleri 0 - 10 aralığında değer alırken CFC değerleri 0 - 100 aralığında değişmektedir. Farklı ölçekte olan bu veri setlerini kıyaslamak için CFC değerleri 0 - 10 aralığına normalize edilmiştir. Çalışma alanı olarak Türkiye ve DAG yerleşkesi ele alınmıştır. Türkiye 26 - 45° doğu boylamları ile 36 - 42° kuzey enlemleri arasında yer alırken DAG 3170 m rakımda Karakaya - Erzurum tepesinde 39.78° Kuzey enlemi ve 41.23° Doğu boylamında yer almaktadır. [Şekil 1](#)'de çalışma alanını ve tutarlılık için kullanılan istasyonlar ile DAG konumunu gösteren harita, [Tablo 1](#)'de ise kullanılan yer istasyonlarının enlem, boylam, rakım ve şehir bilgileri verilmiştir. İstasyonların güncel bilgilerine MGM (Meteoroloji Genel Müdürlüğü) kaynaklarından ulaşılabilir ([MGM, 2021a](#)).



Şekil 1. Çalışma alanı

Türkiye deniz seviyesinden ortalama 1130 m yüksekliğe sahip olup yıllık ortalama sıcaklık değerleri 3.6 °C ile 20.1 °C arasında değişmektedir ([Deniz vd. 2011](#)). Yıllık ortalama yağış miktarı 648 mm civarında iken,

ortalama güneşlenme süresi 6.9 saat/gün ve ortalama global güneş radyasyonu 4.2 kWsa/m<sup>2</sup> değerindedir. Türkiye'nin Akdeniz ve Ege kıyıları ile Marmara bölgesinde Akdeniz iklimi, iç kısımlarında karasal iklim ve Karadeniz bölgesinde ise Karadeniz iklimi özellikleri görülür (Iyigun vd. 2013; Kaba vd. 2018; Sahin ve Cigizoglu 2012). Erzurum'da karasal iklim özellikleri görülmektedir. Kışlar uzun ve karlı, yazlar ise kısa ve ılık geçmektedir. Erzurum şehir merkezinde bulunan meteoroloji istasyonu 1929 yılından beri gözlem yapmaktadır. Yaklaşık 90 yıllık gözlemlerden elde edilen sonuçlara göre, ilde en soğuk geçen ayların ortalaması, -9.2 °C, en sıcak geçen ayların ortalaması ise 19.5°C olarak ölçülürken; en düşük sıcaklık -37.2 °C, en yüksek sıcaklık ise 36.5 °C olarak ölçülmüştür. Ayrıca yine MGM kayıtlarına göre yıllık yağış miktarı yaklaşık 432.2 mm'dir. En az yağış kış döneminde kar şeklinde düşmekte olup kar yağışlı gün sayısı yaklaşık olarak 50 gündür. Kar örtüsü süresi ise yaklaşık 114 gündür. İl en fazla yağışı ilkbahar ve yaz mevsiminde almaktadır (MGM, 2021b; Toy ve Kantor, 2017).

Tablo 1

Çalışmada kullanılan meteorolojik yer istasyonlarının konum bilgileri

İstasyon Numarası	Enlem (Derece)	Boylam (Derece)	Rakım (m)	Şehir	İstasyon Numarası	Enlem (Derece)	Boylam (Derece)	Rakım (m)	Şehir
17022	41.45	31.78	135	Zonguldak	17150	39.63	27.92	102	Balıkesir
17030	41.34	36.26	4	Samsun	17155	39.42	29.99	969	Kütahya
17038	41.00	39.78	39	Trabzon	17172	38.47	43.35	1675	Van
17040	41.04	40.50	3	Rize	17190	38.74	30.56	1034	Afyonkarahisar
17062	40.97	29.06	16	İstanbul	17196	38.69	35.50	1094	Kayseri
17066	40.77	29.93	76	Kocaeli	17201	38.64	39.26	989	Elâzığ
17069	40.77	30.39	30	Sakarya	17220	38.39	27.08	29	İzmir
17070	40.73	31.60	743	Bolu	17237	37.76	29.09	425	Denizli
17074	41.37	33.78	800	Kastamonu	17244	37.98	32.57	1031	Konya
17078	41.20	32.62	259	Karabük	17255	37.58	36.92	572	Kahramanmaraş
17086	40.33	36.56	611	Tokat	17261	37.06	37.35	854	Gaziantep
17090	39.74	37.00	1294	Sivas	17265	37.76	38.28	672	Adıyaman
17094	39.75	39.49	1216	Erzincan	17270	37.16	38.79	550	Şanlıurfa
17096	39.95	41.19	1758	Erzurum	17280	37.90	40.20	674	Diyarbakır
17116	40.23	29.01	100	Bursa	17300	36.91	30.80	64	Antalya
17123	39.81	30.53	787	Eskişehir	17340	36.78	34.60	7	Mersin
17130	39.97	32.86	891	Ankara	17351	37.00	35.34	23	Adana
17135	39.84	33.52	751	Kırıkkale	17355	37.10	36.25	94	Osmaniye
17140	39.82	34.81	1301	Yozgat	17370	36.59	36.15	4	Hatay

CM SAF'ın vizyonu Dünya ikliminin anlaşılması için yüksek kalitede uydu bazlı küresel enerji ve su döngüsü ürünleri geliştirme, arşivleme ve dağıtma ile ilgili sürdürülebilir hizmetleri sağlamaktır. CM SAF, METEOSAT verilerinden iklimsel çalışmalar için atmosferimize ait çeşitli veri setleri üretmektedir. Bu verilerden biri olan ve 1991 - 2015 yılları arasında kapsayan CFC verisidir (Bojanowski vd., 2018; CM SAF, 2017; Stöckli vd., 2017). CFC ürünü METEOSAT uydularındaki (MSG 1, 2, 3 ve 4) SEVIRI (The Spinning Enhanced Visible and InfraRed Imager; Dönen Gelişmiş Görünür ve Kızılötesi Görüntüleyici) ve SEVIRI'nin öncülü olan MVIRI (Meteosat Visible and Infrared Imager; Meteosat Görünür ve Kızılötesi Görüntüleyici) algılayıcısının geniş bant (METEOSAT 1 - 7) ve 10.8 µm kanalları kullanılarak 1991 - 2015 yıllarını ve METEOSAT kapsama alanını (METEOSAT Full disk) içerecek şekilde üretilmiştir. CFC uzun



dönem iklim verisi olması nedeniyle iklimsel çalışmalar için çok uygun bir veri setidir. SEVIRI ve MVIRI algılayıcılarının yüksek zamansal ( $\leq 30$  dk) ve konumsal ( $\leq 5$  km) çözünürlükleri CFC ürünü için yeterli/etkili çözünürlük sağlamıştır. METEOSAT geniş bir alanı kapsamaması nedeniyle Avrupa, Afrika ve Atlas okyanusu alanları için CFC verileri iklimsel çalışmalara izin verir. CFC verisi saatlik, günlük ve aylık olarak dağıtılmaktadır. CFC verisinin yer-konuşlu meteoroloji istasyonlarından elde edilen veriye göre doğruluk testi günlük değerlerden yapılarak analizler için saatlik, günlük ve aylık CFC değerleri kullanılmıştır. Çalışmada analiz edilmek üzere indirilen veriler günlük 9131 adet netcdf (Network Common Data Form) dosyası olup toplam boyutu 55 GB, aylık 300 adet netcdf dosyası olup toplam boyutu 1.1 GB ve aylık ortalama saatlik veri 300 adet netcdf dosyası olup toplam 36 GB boyutundadır. CFC ürünü yüksek seviye (Level 3) ürün olup piksel çözünürlüğü 0.05 derecedir ( $\sim 5.5$  km) ve piksel değerleri bulutluluğu yüzdesel (%0 - %100) olarak vermektedir.

## 2.2. Yöntem

Bu çalışmada uydu verileri ile yer verileri arasındaki ilişki değerlendirilmek amacıyla korelasyon analizi kullanılmıştır. Eşitlik 2.1'de CFC değişkeni uydu bulut verisine, MGM değişkeni ise yer bulut verisine karşılık gelmektedir. CM SAF CFC ürününün Türkiye genelindeki yer-konuşlu meteoroloji istasyonlarından alınan veri ile karşılaştırmak ve sonuçlarını değerlendirmek için istatistiksel parametreler kullanılmıştır. Bu parametrelerden  $r^2$  (r: Linear Correlation Coefficient-Lineer Korelasyon Katsayısı), MBE (Mean Bias Error; Ortalama Yanlı Hata), MAE (Mean Absolute Error; Ortalama Mutlak Hata) ve RMSE (Root Mean Square Error; Kare Ortalama Karekök Hata) eşitlik 2.2'den 2.5'e kadar verilen ifadelerle hesaplanır. Bu ifadelerde,  $n$  toplam veri sayısı olup  $G_i$ , ve  $\bar{G}$  sırasıyla meteorolojik yer istasyonlarında ölçülen bulut verileri ve bu verilerin ortalamasıdır.  $S_i$ , ve  $\bar{S}$  ise uydudan hesaplanan bulut verileri ve bu verilerin ortalamasıdır.  $r^2$ , modeldeki bağımsız değişkenler tarafından açıklanan varyans miktarını temsil eder. MBE, yerden ölçülen bulut değerleri ile uydudan hesaplanan bulut değerleri arasındaki farkların ortalamasıdır ve MBE, yapılan tahminin gerçek değerlerden daha yüksek veya daha düşük olduğu bilgisini sağlar. MAE, yönlerini dikkate almadan bir dizi tahmindeki hataların ortalama büyüklüğünü verir. RMSE, aynı zamanda hatanın ortalama büyüklüğünü de ölçen ikinci dereceden bir hata hesaplama kuralıdır. İki nicelik arasında yüksek bir doğruluk için,  $r^2$  değeri yüksek (bire yaklaşımalı) ve MBE, MAE ve RMSE değerleri düşük (sıfıra yaklaşımalı) olmalıdır.

$$MGM = m * \left( \frac{CFC}{10} \right) + b \quad (2.1)$$

$$r^2 = \frac{[\sum_{i=1}^n (G_i - \bar{G})(S_i - \bar{S})]^2}{\sum_{i=1}^n (G_i - \bar{G})^2 \sum_{i=1}^n (S_i - \bar{S})^2} \quad (2.2)$$

$$MBE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (G_i - S_i) \quad (2.3)$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |G_i - S_i| \quad (2.4)$$



$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (G_i - S_i)^2} \quad (2.5)$$

### 3. Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmanın temel amacı DAG yerleşkesinde bulut değerlerinin zamansal analizinin yapılarak yıllara göre gözlem yapılabilecek açık gün sayılarının belirlenmesidir. Eğer bir gözlemevinin uzun dönem iklimsel özellikleri bilinirse gelecek için sınırlı bir ölçüde olsa da tahminler yapılarak uygun gözlem zamanları ve gözlem türleri belirlenebilir. Ayrıca bir gözlemevinin geniş zaman aralığına yayılmış atmosferik değerleri kullanılarak geçmiş, mevcut ve gelecekteki atmosferik koşullar hakkında bilgi elde edilebilir. Bu durumda atmosferik koşulların kötüye gitmesine karşın kaliteli gözlem ürünleri elde edebilmek için önlem alınabilir. Örneğin gözleminde kullanılan cihazların özellikleri geliştirilebilir, hatta gözlemevinin taşınmasına bile karar verilebilir. Bu amaç için CM SAF CFC ürünü, geniş zamansal arşivi (1991 - 2015) nedeniyle tercih edilmiştir. CFC ürünü son kullanıcıya yönelik, üst seviye (Level 3), veri ön işleme ve veri işleme aşamalarına ihtiyaç duyulmadan doğrudan kullanıma hazır bir veri setidir. Bu veri seti ile DAG için bulutluluk analizi yapılmadan önce günlük CFC verilerinin başarımlı test edilmiştir. Türkiye arazisine/alanına mümkün olduğunca homojen dağılmış 38 adet meteoroloji istasyonunda ölçülen günlük bulut değerleri ve günlük CFC görüntülerinden bu istasyon konumlarına denk gelen piksel değerleri arasındaki korelasyon analiz edilmiştir. Bu iki nicelik arasındaki lineer korelasyona ilişkin katsayılar (m, b) ve ilgili istatistiksel parametreler [Tablo 2](#)'de verilmiştir. DAG konumuna en yakın MGM istasyonu olması nedeniyle 17096 - Erzurum istasyonuna ait bulut değerleri ile bu konuma denk gelen CFC bulut değerlerinin dağılım grafiği ise [Şekil 2](#)'de verilmiştir. Erzurum istasyonu ile DAG yerleşkesi arasındaki kuş bakışı uzaklık yaklaşık 17 km olup MGM yer istasyonlarında ölçülen bulut değerleri 20 km'lik çapa sahip bir alanı temsil etmektedir. [Şekil 2](#)'deki dağılım grafiği MGM Erzurum yer istasyonu ölçümü ile Erzurum istasyonuna denk gelen CFC değerlerini göstermektedir. Hem yer hem de uydu ölçümünün günlük ortalama bulutluluk değerleri kullanılmıştır. MGM istasyonlarında 07, 14 ve 21 yerel saatlerinde yapılan bulut ölçümlerinden elde edilen günlük ortalama bulut değerleri 0 - 10 aralığında değer alırken CFC değerleri 0 - 100 aralığında değişmektedir. Farklı ölçekte olan bu veri setlerini kıyaslamak için CFC değerleri 0 - 10 aralığına normalize edilmiştir.

Tablo 2

MGM ve CFC verileri arasındaki ilişki katsayıları ve istatistiksel parametreler

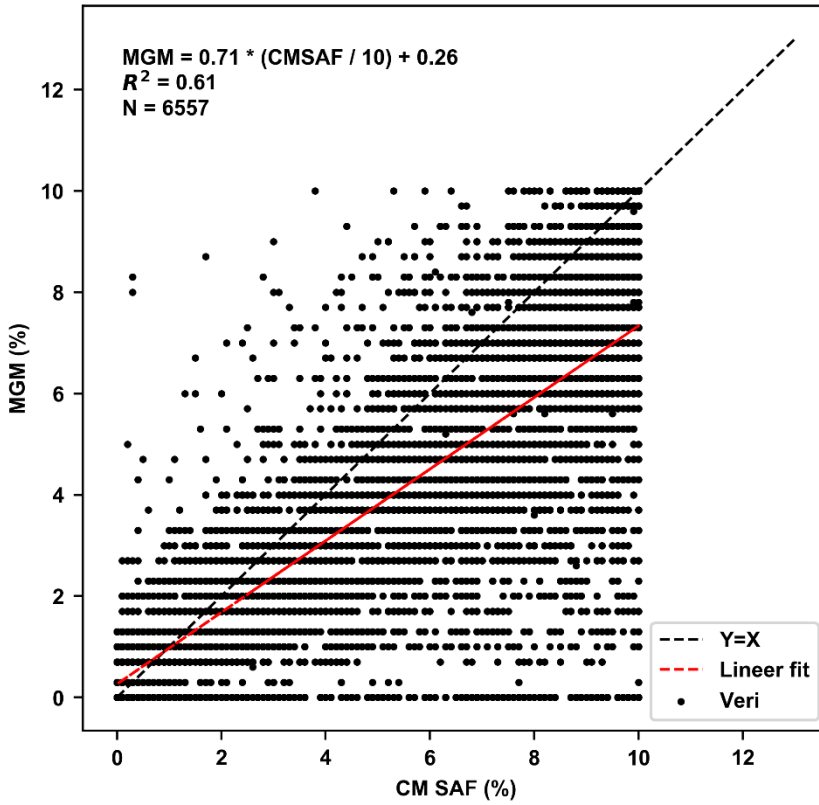
İstasyon Numarası	m	b	r <sup>2</sup>	MBE	MAE	RMSE	İstasyon Numarası	m	b	r <sup>2</sup>	MBE	MAE	RMSE
17022	0.82	0.23	0.81	-0.79	1.31	1.76	17150	0.79	0.38	0.81	-0.59	1.22	1.67
17030	0.77	0.78	0.79	-0.60	1.29	1.65	17155	0.83	0.36	0.74	-0.47	1.34	1.89
17038	0.68	1.64	0.72	-0.51	1.41	1.76	17172	0.79	0.02	0.77	-0.95	1.39	1.87
17040	0.83	0.09	0.74	-1.02	1.50	1.97	17190	0.83	0.19	0.77	-0.63	1.23	1.78
17062	0.84	-0.27	0.80	-1.10	1.46	1.95	17196	0.79	0.15	0.75	-0.91	1.39	1.97
17066	0.80	0.76	0.79	-0.37	1.21	1.66	17201	0.83	0.32	0.80	-0.41	1.13	1.65
17069	0.83	0.15	0.79	-0.82	1.36	1.81	17220	0.77	0.22	0.86	-0.64	1.07	1.49
17070	0.78	0.54	0.72	-0.70	1.47	1.94	17237	0.83	-0.10	0.85	-0.82	1.12	1.60
17074	0.84	0.00	0.75	-0.92	1.45	1.97	17244	0.80	0.27	0.79	-0.61	1.21	1.66
17078	0.75	0.30	0.70	-1.12	1.61	2.24	17255	0.88	-0.32	0.86	-0.78	1.05	1.55
17086	0.80	0.28	0.80	-0.82	1.30	1.75	17261	0.86	-0.22	0.80	-0.73	1.14	1.74

Tablo 2'nin devamı.

İstasyon Numarası	m	b	r <sup>2</sup>	MBE	MAE	RMSE	İstasyon Numarası	m	b	r <sup>2</sup>	MBE	MAE	RMSE
17090	0.79	0.24	0.73	-0.81	1.39	1.98	17265	0.89	0.09	0.89	-0.34	0.84	1.24
17094	0.81	0.20	0.77	-0.77	1.31	1.83	17270	0.81	-0.12	0.84	-0.78	1.05	1.58
17096	0.71	0.26	0.61	-1.35	1.78	2.51	17280	0.84	0.09	0.85	-0.54	1.00	1.49
17116	0.81	-0.09	0.82	-1.05	1.38	1.87	17300	0.80	0.34	0.86	-0.35	0.94	1.28
17123	0.81	0.47	0.81	-0.43	1.15	1.59	17340	0.71	0.89	0.78	-0.19	1.22	1.57
17130	0.68	1.63	0.46	0.06	1.78	2.78	17351	0.76	0.77	0.76	-0.14	1.20	1.63
17135	0.73	1.29	0.50	-0.03	1.71	2.68	17355	0.79	0.67	0.75	-0.17	1.25	1.74
17140	0.82	0.01	0.73	-0.87	1.43	2.01	17370	0.72	0.76	0.75	-0.44	1.32	1.72

(Çalışmada kullanılan lineer denklem:  $MGM = m * \left(\frac{CFC}{10}\right) + b$ )

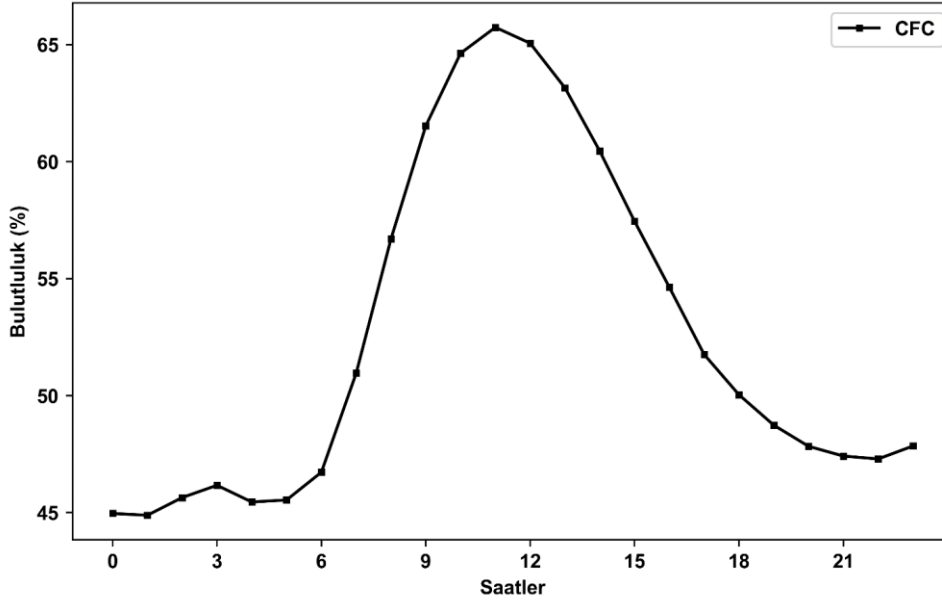
[Tablo 2](#)'den r<sup>2</sup> değerleri incelendiğinde iki bulut verisi arasındaki en düşük tutarlılığın olduğu istasyon 0.46 değeri ile 17130 - Ankara istasyonudur. En yüksek uyumun olduğu istasyon ise 0.89 değeri ile 17265 - Adıyaman istasyonudur. 38 adet test istasyonunun r<sup>2</sup> değerleri 0.46 - 0.89 arasında değişmekte ve tüm istasyonların ortalama r<sup>2</sup> değeri 0.77 olarak elde edilmiştir. Başka bir ifadeyle korelasyon katsayısı (r) 0.77 - 0.94 aralığında değişmekte ve tüm istasyonların ortalama r değeri 0.88 olarak hesaplanmıştır. Bu değer istatistiksel veri grupları arasında güçlü bir lineer korelasyon bulunduğu anlamına gelse de iki farklı yöntemle elde edilen bulut değerlerinin uyumunun daha yüksek olması beklenen/istenilen bir durumdur. 15 adet istasyonun r<sup>2</sup> değeri ortalamanın (0.77) altında olup bu istasyonlardan beş tanesi (Trabzon, Rize, Bolu, Kastamonu ve Karabük) Karadeniz bölgesinde, beş tanesi (Sivas, Ankara, Kırıkkale, Yozgat ve Kayseri) İç Anadolu bölgesinde üç tanesi (Adana, Osmaniye ve Hatay) Akdeniz bölgesinde ve diğer ikisi Erzurum ile Kütahya istasyonlarıdır. Bu istasyonlar incelendiğinde Erzurum ve Kütahya hariç diğer istasyonların üç farklı bölgede (Karadeniz, İç Anadolu ve Akdeniz) konum olarak birbirine yakın olduğu görülür. Bu düşük uyumun olduğu istasyonlar hem deniz etkisinin olduğu, hem de deniz etkisinden uzak olan istasyonlar olması bakımından uydu ölçümü (CFC değerleri) için uydu verileri ile arasındaki lineer korelasyonun daha zayıf olduğu istasyonlar hakkında anlamlı bir yorum yapmak mümkün değildir. [Tablo 2](#)'de istasyonların MBE değerlerinin -1.35 ile 0.06 arasında değişmekte olduğu ve tüm istasyonların ortalama MBE değerinin -0.65 olduğu görülmektedir. MBE değerlerinin 17130 - Ankara istasyonu hariç negatif olması tüm bu istasyonlarda CFC verisinin yer ölçümlerinden genelde daha yüksek hesaplandığı anlamına gelir. İstasyonların MAE değerleri 0.84 ile 1.78 arasında değişmekte ve tüm istasyonların ortalama MAE değeri 1.3 olarak hesaplanmıştır. İstasyonların RMSE değerleri 1.24 ile 2.78 arasında değişirken tüm istasyonların ortalama RMSE değeri 1.81 olarak gerçekleşmiştir.



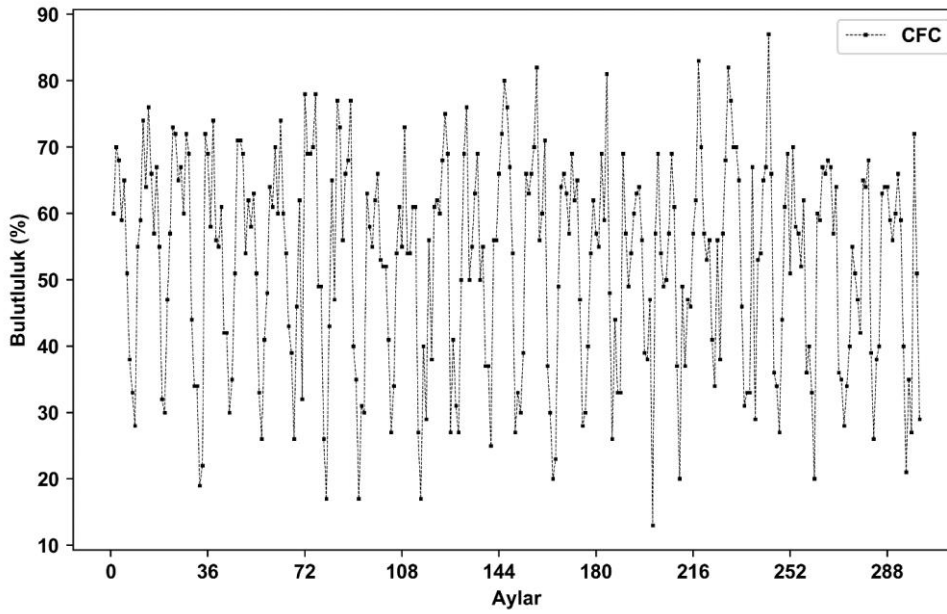
Şekil 2. 17096 - Erzurum istasyonu için MGM ve CM SAF günlük ortalama bulut kapallığı

Her ölçümde olduğu gibi, ister yer ister uydu bazlı ölçüm olsun, bulut değerlerinin ölçümünde de sistematik ve/veya tesadüfi hata bulunmaktadır. Buna bu çalışmada kullanılan CFC ürünü ve meteorolojik yer istasyonlarında gözlemciler tarafından ölçülen bulut değerleri de dahildir. MGM ölçümlerinde zamansal sürekliliğin olmaması ve insan faktörü gibi nedenlerden dolayı hata meydana gelmektedir. Öte yandan uydu kayıtlarında ise uydu görüş açısı arttıkça görüntülerin kenar kısımlarına doğru hassasiyet düşebilir. Bu hata kaynakları dikkate alındığında her istasyon için aynı doğrulukta ve hassasiyette ölçüm yapılması beklenemez. Bu nedenle tutarlılık sonuçları her bir istasyon için farklı çıkmaktadır. CFC ürün tutarlılık çalışmaları CFC ürününün MODIS, PATMOS-x, CLARA-A2, CLAAS-A2 ve CC4CL-AVHRR veri setlerine göre daha yüksek bulutluluk değerleri verdiği belirtilmiştir (CM SAF, 2017). Bu bilgiye ve Erzurum tutarlılık sonuçlarına rağmen bu verinin özellikle geniş kapsama alanı ve arşivi sayesinde (25 yıl) bölgesel kıyaslamalar ve zamansal analizler bakımından değerli bilgiler içereceği düşüncesiyle DAG yerleşkesinin bulutluluk analizleri CFC veri setleri kullanılarak yapılmıştır.

[Şekil 3](#) DAG yerleşkesi için 1991 - 2015 yılları arasındaki verilerden elde edilmiş uzun yılların saatlik ortalama bulutluluk değerlerini göstermektedir. Grafik incelendiğinde yüksek bulutluluk değerlerinin gündüz saatlerinde ve düşük bulutluluk değerlerinin ise gözlemlerin yapıldığı gece saatlerinde gerçekleştiği görülür. Astronomik gözlemlerin gece yapılması nedeniyle bu durum gözlemevleri için olumlu bir sonuçtur. DAG yerleşkesi için minimum bulutluluk değeri (%44.89) 01:00 UTC (yerel saate ile 04:00) civarında gerçekleşirken maksimum bulutluluk değeri (%65.74) 11:00 UTC (yerel saate ile 14:00) civarında meydana gelmektedir. Grafikten 01:00 UTC zamanında DAG bulutluluk oranı minimum iken 03:00 UTC zamanında (yerel saat ile 06:00, alaca karanlık zamanı) bir pik görülmektedir. 05:00 UTC zamanından sonra DAG yerleşkesinin bulutluluk değerleri artışa geçmekte ve 11:00 UTC zamanında maksimum değere ulaşmaktadır. Bu saatten itibaren bulutluluk azalarak gözlemlerin yapıldığı gece saatlerinde düşük değerlere ulaşmaktadır.

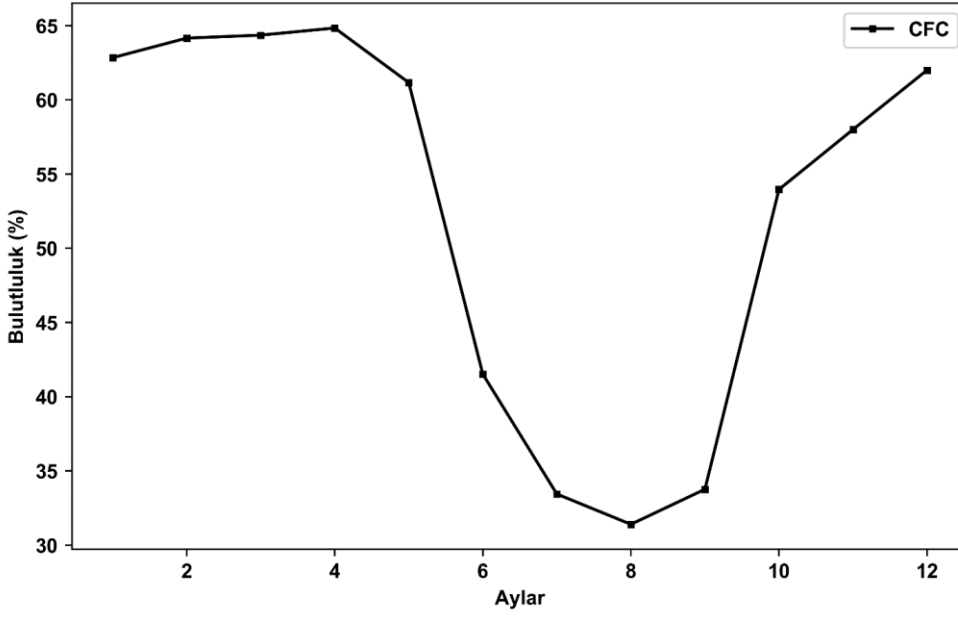


Şekil 3. DAG yerleşkesi için saatlik ortalama CFC değerleri

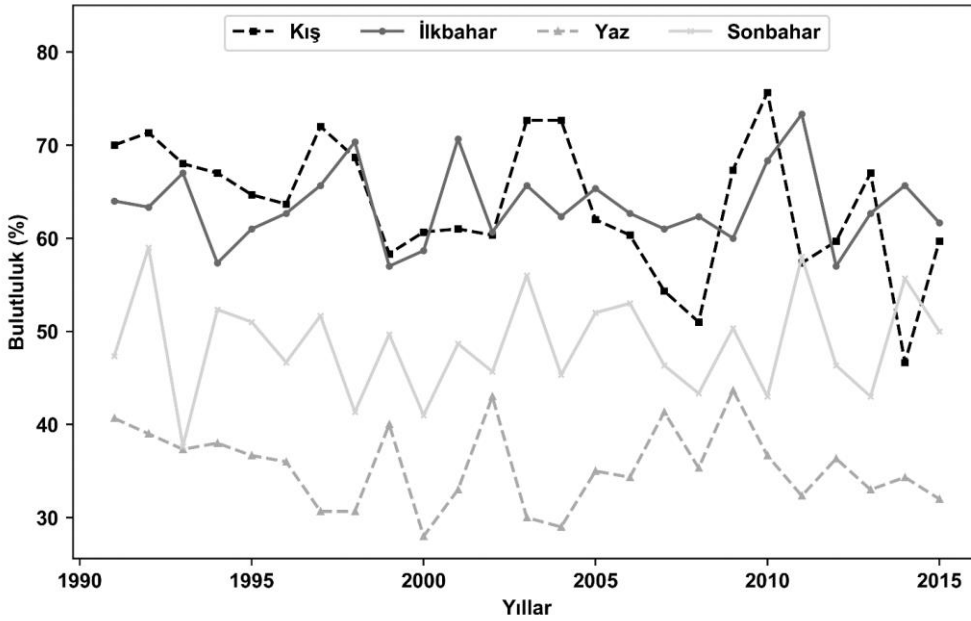


Şekil 4. DAG yerleşkesi için aylık ortalama CFC değerleri

Şekil 4 ve Şekil 5'te DAG için CFC bulut değerlerinin sırasıyla gözlem yapılan süre boyunca elde edilen aylık ortalamaları ve uzun yıllar boyunca elde edilen veriden yılın her bir ayı için ortalamaları verilmiştir. Şekil 4'te DAG aylık ortalama bulut değerleri %13 (2007, Eylül) ile %87 (Nisan 2011) aralığında ve ortalama %52.62 civarında değişmektedir. Ayrıca DAG yerleşkesi için 1991 yılından 2015 yılına doğru bulutluluk oranının azalma eğiliminde olduğu hesaplanmıştır. Bu durum iklim, tarım ve hidroloji gibi pek çok disiplin için olumsuzluk oluşturmaya karşın astronomi için olumlu bir durumdur. Şekil 5'ten DAG yerleşkesi için yüksek bulut değerlerinin Aralık - Mayıs (%50'den fazla) ve düşük bulut değerlerinin Haziran - Kasım (%50'den az) ayları arasında gerçekleştiği görülür. Bu bilgiye göre Haziran - Kasım arasında astronomik gözlem yapma olasılığının daha yüksek olacağı değerlendirilmelidir. DAG yerleşkesi için minimum bulutluluk oranı (%31.40) Ağustos ayında iken maksimum (%64.84) bulutluluk oranı Nisan ayında gerçekleşmiştir.



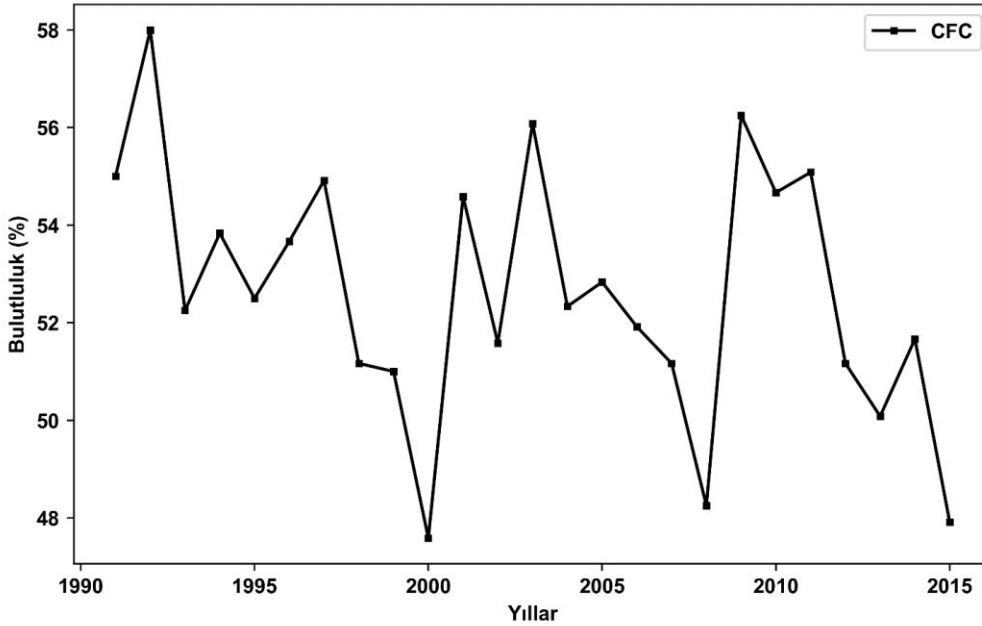
Şekil 5. DAG yerleşkesi için uzun yıllara yayılan veriden elde edilen aylık ortalama CFC değerleri



Şekil 6. DAG yerleşkesi için mevsimsel ortalama CFC değerleri

Şekil 6'da DAG için mevsimlik bulut değişimleri verilmiştir. Şekil 6'dan ilkbahar ve kış bulut değerlerinin hem yüksek hem de yıllara göre çok değişkenlik gösterdiği ve yaz ile sonbahar bulut değerlerinin ise nispeten daha düşük ve yıllara göre daha kararlı olduğu görülür. Öte yandan 1991 yılından 2015 yılına kadar mevsimsel değerlerin eğilimi kış ve yaz mevsimleri için belirgin şekilde düşüş gösterirken ilk bahar ve sonbahar mevsim değerlerinin artış eğiliminde olduğu hesaplanmıştır. Özetle Şekil 6'daki DAG yerleşkesinin mevsimsel grafiklerinden astronomik gözlem için en fazla açık gün bulunan mevsimler yaz ve sonbahar mevsimleridir. Bu mevsimsel sonuçların aylık değerler (Şekil 5) ile uyumlu olduğu açık bir şekilde görülür. Şekil 7'de DAG yerleşkesi için CFC verilerinden yıllık bulut değerlerinin değişimleri verilmiştir. Şekil 7'de DAG için minimum (%47.58) ve maksimum (%58) bulut değerleri 2000 ve 1992 yıllarında gerçekleşirken diğer yılların değerleri bu aralıkta değişmektedir. Tüm bu yılların ortalama değeri ise %52.62

olarak hesaplanmıştır. Ayrıca 1991 yılından 2015 yılına kadar bulut değerlerinin azalma eğiliminde olduğu hesaplanmıştır. Bu durum ise iklim değişikliğinin bir sonucu olarak değerlendirilebilir.



Şekil 7. DAG yerleşkesi için yıllık ortalama CFC değerleri

DAG yerleşkesi için yıllık gözlem yapılabilir gün sayısını belirlemek amacıyla CM SAF günlük CFC görüntülerindeki DAG konumuna karşılık gelen piksel değerleri üç kategoriye ayrılmıştır: Piksel değeri %25'ten küçük olanlar “açık”, %25 ile %75 arasında olanlar “parçalı bulutlu” ve %75'ten büyük olanlar “kapalı hava” olarak gruplandırılmıştır (Mekhaimr, 2017). Açık olarak belirtilen ışıkölçüm (fotometrik) ve parçalı bulutlu olarak tanımlanan tayfölçüm (spektroskopik) gözlemlerin yapılabileceği hava şartlarını ifade etmektedir. Bu kriterlere göre DAG için elde edilen değerler yıllara göre Tablo 3'te ve Şekil 8'de verilmiştir. Tablo 3 incelendiğinde tüm yılların ortalama “açık” gün sayısının 87, “parçalı bulutlu” gün sayısının 168 ve “kapalı hava” gün sayısının 109 olarak hesaplandığı görülebilir. Bu ortalama değerlere göre “açık” ve “parçalı bulutlu” günlerin toplamı 255 gün olup, bu yılda gözlem yapılabilecek maksimum gün sayısı için iyi bir tahmindir. Öte yandan CFC bulutluluk değerlerinin hem yüksek olması hem de gündüz bulutluluk miktarının yüksek olduğu düşünüldüğünde gerçek gözlem yapılabilir gece sayılarının Tablo 3'te verilen değerlerden daha yüksek olacağı beklenmelidir. Ayrıca Tablo 3 ve Şekil 8'den “kapalı hava” ve “parçalı bulutlu” değerlerin azalma eğiliminde ve “açık” değerlerin ise artış eğiliminde olduğu görülebilir. Bu durum kaliteli astronomik gözlem zamanlarının artışı anlamına gelir. Türkiye için yapılan astronomik gözlemevi yer seçim çalışması (Aksaker vd., 2015) ve DAG için yapılan çalışma (Yüzlükoğlu, 2017) dikkate alındığında bu bölümde verilen CM SAF bulutluluk değerleri bu iki çalışmadaki bulgularla uyumlu bulunmamıştır. Bu çalışmalarda hem farklı meteorolojik verilerin kullanılması hem de kullanılan yöntemlerin/kriterlerin farklı olması nedeniyle elde edilen sonuçlar da farklılık göstermiştir. CM SAF CFC ürün tutarlılık çalışmaları CFC ürününün MODIS, PATMOS - X, CLARA - A2, CLAAS - A2 ve CC4CL - AVHRR veri setlerine göre daha yüksek bulutluluk değerleri verdiği belirtilmiştir. CFC bulut verisinde uydu alt noktasındaki piksellerin görüntüdeki kenar piksellere göre daha tutarlı olduğu başka bir ifadeyle uydu zenit açısının artmasıyla ürün başarımının düştüğü belirtilmiştir (CM SAF, 2017). Türkiye ve DAG alanları ise CFC görüntülerinde uydu alt noktasından uzak olup kenara yakın bölümde yer almaktadır. Bu olumsuzluklara rağmen bu veri seti özellikle geniş arşivi sayesinde (25 yıl) değerli bilgiler içermektedir. Bu ürün uydu kapsama alanına düşen noktaların birbiriyle kıyaslanmasını sağlayabilir ya da bir noktanın bulutluluk trendini daha doğru bir şekilde verebilir. Ayrıca, bir gözlemevinin iklimsel özelliklerinin değişimi hakkında bilgi sunar. Fakat bunlar

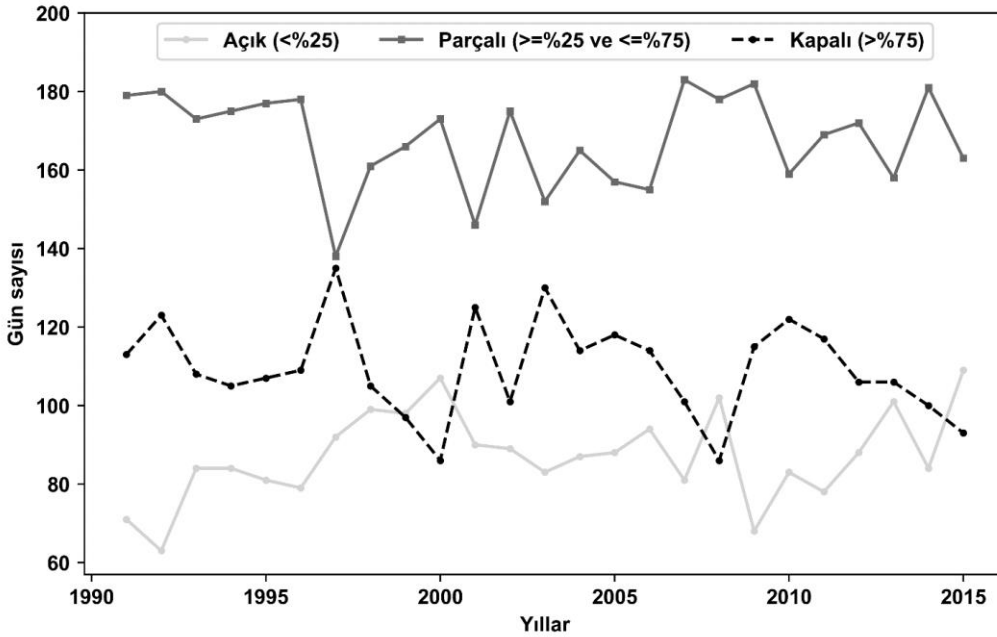


astronomik gözlem zamanını belirlemek üzere bu ürünü kullanmak için yeterli olmayabilir. CFC ürünü bulutluluk oranını ve bulut maskesi ürünleri de bulut olup olmadığı bilgisinin sağlamaktadır. Oysa parçalı bulutlu ve yarı geçirgen (kümülüs ve sirus gibi) bazı bulut türlerinin varlığında da astronomik gözlemler yapılabilir. Bu nedenle bulutluluk oranı, bulut maskesi ve bulut tipi ürünlerinin birlikte kullanılması bir gözlemevinin açık gün sayısının belirlemek adına daha doğru sonuçlar verebilir.

Tablo 3

CFC verilerine göre DAG yerleşkesinin yıllık gözlem durumu

Yıllar	Açık (<%25)	Parçalı Bulutlu (>=%25 ve <=%75)	Kapalı Hava (>%75)	Yıllar	Açık (<%25)	Parçalı Bulutlu (>=%25 ve <=%75)	Kapalı Hava (>%75)
1991	71	179	113	2004	87	165	114
1992	63	180	123	2005	88	157	118
1993	84	173	108	2006	94	155	114
1994	84	175	105	2007	81	183	101
1995	81	177	107	2008	102	178	86
1996	79	178	109	2009	68	182	115
1997	92	138	135	2010	83	159	122
1998	99	161	105	2011	78	169	117
1999	98	166	97	2012	88	172	106
2000	107	173	86	2013	101	158	106
2001	90	146	125	2014	84	181	100
2002	89	175	101	2015	109	163	93
2003	83	152	130				

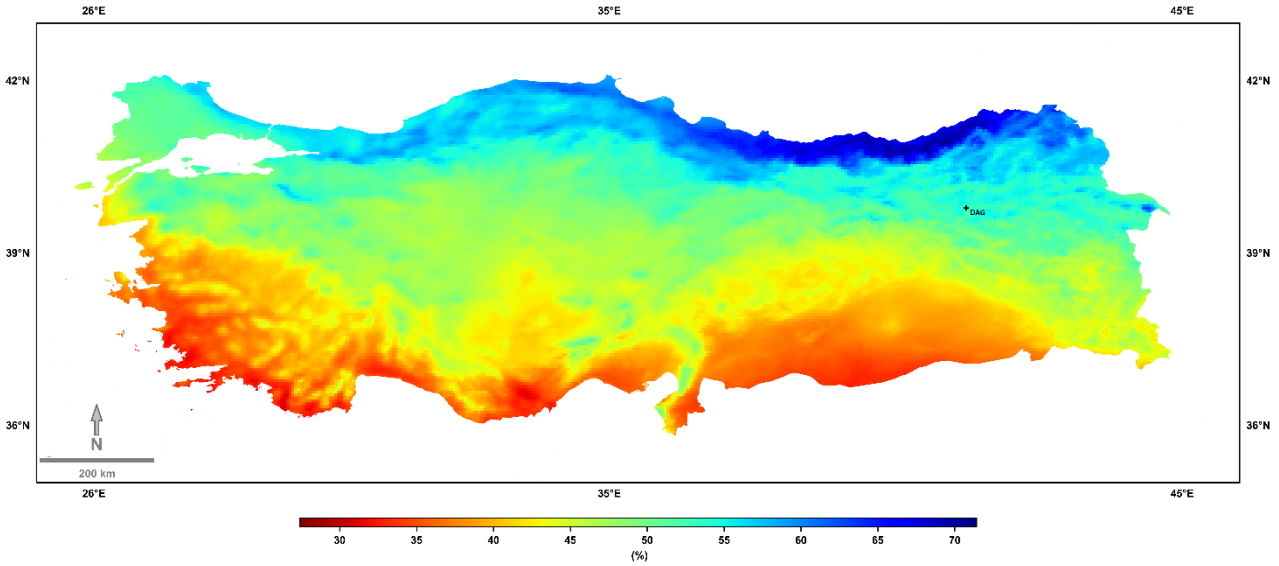


Şekil 8. CFC verilerine göre DAG yerleşkesinin yıllık gözlem durumu

Şekil 9’da Türkiye’nin geniş bir zaman aralığı için yıllık ortalama CFC bulutluluk haritası verilmiştir. METEOSAT tüm görüntü ortalama haritada (65 derece kuzey ve güney enlemleri ile 65 derece doğu ve batı



boylamlarını kapsıyor) minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla, %8.83, %89.43, %53.89 ve %27.30 iken Türkiye haritasında minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla, %27.40, %71.41, %46.16 ve %10.19 olarak gerçekleşmiştir. DAG için ise ortalama değer %52.62 olup bu değer Türkiye ortalamasının yaklaşık %6 üzerindedir. CFC verisi bulutluluğu yüksek ölçmesine rağmen görüntü içinde ele alınan noktaların kıyaslanması anlamlı sonuç verecektir. Türkiye haritasında Güney ve Ege kıyıları düşük bulutluluğa sahip iken Kuzeye doğru gidildikçe bulutluluk oranı artmakta ve en bulutlu bölgemiz Doğu Karadeniz bölgemiz olarak ortaya çıkmaktadır.



Şekil 9. CFC uzun yıllık (1991 - 2015) Türkiye bulut atlası

#### 4. Sonuçlar

CM SAF günlük CFC değerleri yer-konuşlu meteoroloji istasyonlarından elde edilen bulutluluk değerleri ile karşılaştırılmış ve DAG yerleşkesi için saatlik, günlük, aylık, mevsimsel ve yıllık bulutluluk analizi yapılarak DAG için yıllara göre açık gün sayıları hesaplanmıştır. Analizler sonucunda lineer korelasyon katsayısı ( $r$ ) 0.77 - 0.94 aralığında değişmekte ve tüm istasyonlar için ortalama  $r$  değeri 0.88 olarak hesaplanmıştır.  $r^2$  değerleri incelendiğinde yer ve uydu bulut verileri arasındaki en düşük tutarlılığın olduğu istasyon 0.46 değeri ile 17130 - Ankara istasyonudur. En yüksek uyumun olduğu istasyon ise 0.89 değeri ile 17265 - Adıyaman istasyonudur. DAG yerleşkesi için 1991 - 2015 yılları arasındaki verilerden elde edilmiş uzun yılların saatlik ortalama bulutluluk değerlerine göre yüksek bulut değerleri gündüz saatlerinde ve düşük bulut değerleri astronomik gözlemlerin yapıldığı gece saatlerinde gerçekleşmiştir. DAG yerleşkesi için minimum bulutluluk oranı (%31.40) Ağustos ayında iken maksimum (%64.84) bulutluluk oranı Nisan ayında gerçekleşmiştir. DAG yerleşkesi için yıllık ortalama minimum (%47.58) ve maksimum (%58) bulut değerleri 2000 ve 1992 yıllarında gerçekleşirken 1991 - 2015 zaman diliminde bulut değerleri azalma eğilimindedir. DAG yerleşkesi için tüm yılların ortalama “açık” gün sayısı 87, “parçalı bulutlu” gün sayısı 168 ve “kapalı hava” gün sayısı 109 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca “kapalı hava” ve “parçalı bulutlu” değerlerin azalma eğiliminde ve “açık” değerlerin ise artış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Türkiye haritasında minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla, %27.40, %71.41, %46.16 ve %10.19 olarak gerçekleşmiştir. DAG için ise ortalama değer %52.62 olup bu değer Türkiye ortalamasının yaklaşık %6 üzerindedir.

## Teşekkür

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Astrofizik Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATASAM) Doğu Anadolu Gözlemevi (DAG) Projesi (Proje No: 2011K120230) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK) 2218 Programı (Proje No: TÜBİTAK-2218 2018/2) kapsamında desteklenmiştir. ATASAM ve TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

Bu yayın TÜBİTAK-2218-Yurt İçi Doktora Sonrası Araştırma Burs Programından (Proje No: 2218 2018/2) yararlanılarak oluşturulmuştur. Ancak yayın ile ilgili tüm sorumluluk yayının sahibine aittir. TÜBİTAK'tan alınan maddi destek, yayının içeriğinin bilimsel anlamda TÜBİTAK tarafından onaylandığı anlamına gelmez.

## Yazar Katkıları

Kazım Kaba: Çalışma konusunun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi, yöntemin belirlenmesi, materyalin hazırlanması, analizlerin gerçekleştirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve çalışmanın makale haline getirilmesine katkı sağlamıştır.

Cahit Yeşilyaprak: Çalışma konusunun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi, analizlerin gerçekleştirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve çalışmanın makale haline getirilmesine katkı sağlamıştır.

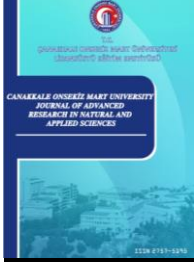
## Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## Kaynaklar

- Aksaker, N., Yerli, S. K., Erdoğan, M. A., Erdi, E., Kaba, K., Ak, T., ... & Selam, S. O. (2015). Astronomical site selection for Turkey using GIS techniques. *Experimental Astronomy*, 39(3), 547-566. <https://doi.org/10.1007/s10686-015-9458-x>
- Aksaker, N., Yerli, S. K., Erdoğan, M. A., Kurt, Z., Kaba, K., Bayazit, M., & Yesilyaprak, C. (2020). Global Site Selection for Astronomy. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 493(1), 1204-1216. <https://doi.org/10.1093/mnras/staa201>
- Badescu, V., & Dumitrescu, A. (2016). CMSAF products Cloud Fraction Coverage and Cloud Type used for solar global irradiance estimation. *Meteorology and Atmospheric Physics*, 128(4), 525-535. <https://doi.org/10.1007/s00703-015-0424-y>
- Bojanowski, J. S., Stöckli, R., Duguay-Tetzlaff, A., Finkensieper, S., & Hollmann, R. (2018). Performance Assessment of the COMET Cloud Fractional Cover Climatology across Meteosat Generations. *Remote Sensing*, 10(5), 804. <https://doi.org/10.3390/rs10050804>
- Calisse, P. G., Ashley, M. C., Burton, M. G., Phillips, M. A., Storey, J. W., Radford, S. J., & Peterson, J. B. (2004). Submillimeter site testing at Dome C, Antarctica. *Publications of the Astronomical Society of Australia*, 21(3), 256-263. <https://doi.org/10.1071/AS03018>
- Chernokulsky, A., & Esau, I. (2019). Cloud cover and cloud types in the Eurasian Arctic in 1936–2012. *International Journal of Climatology*, 39(15), 5771-5790. <https://doi.org/10.1002/joc.6187>
- CM SAF (2017). Product User Manual, Meteosat Cloud Fractional Cover (Comet), Edition 1. Erişim adresi: [https://www.cmsaf.eu/SharedDocs/Literatur/document/2017/saf\\_cm\\_meteoswiss\\_pum\\_met\\_cfc\\_1\\_pdf.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.cmsaf.eu/SharedDocs/Literatur/document/2017/saf_cm_meteoswiss_pum_met_cfc_1_pdf.pdf?__blob=publicationFile)
- Deniz, A., Toros, H., & Incecik, S. (2011). Spatial variations of climate indices in Turkey. *International Journal of Climatology*, 31(3), 394-403. <https://doi.org/10.1002/joc.2081>
- Falvey, M., & Rojo, P. M. (2016). Application of a regional model to astronomical site testing in western Antarctica. *Theoretical and Applied Climatology*, 125(3-4), 841-862. <https://doi.org/10.1007/s00704-016-1794-x>
- Hellemeier, J. A., Yang, R., Sarazin, M., & Hickson, P. (2019). Weather at selected astronomical sites—an overview of five atmospheric parameters. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 482(4), 4941-4950. <https://doi.org/10.1093/mnras/sty2982>
- Hidayat, T., Mahasena, P., Dermawan, B., Hadi, T. W., Premadi, P. W., & Herdiwijaya, D. (2012). Clear sky fraction above Indonesia: an analysis for astronomical site selection. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 427(3), 1903-1917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2012.22000.x>

- Iyigun, C., Türkeş, M., Batmaz, İ., Yozgatligil, C., Puruçuoğlu, V., Koç, E. K., & Öztürk, M. Z. (2013). Clustering current climate regions of Turkey by using a multivariate statistical method. *Theoretical and Applied Climatology*, 114(1-2), 95-106. <https://doi.org/10.1007/s00704-012-0823-7>
- Kaba, K., Sarıgül, M., Avcı, M., & Kandırmaz, H. M. (2018). Estimation of daily global solar radiation using deep learning model. *Energy*, 162, 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.07.202>
- Koc-San, D., San, B. T., Bakis, V., Helvacı, M., & Eker, Z. (2013). Multi-Criteria Decision Analysis integrated with GIS and remote sensing for astronomical observatory site selection in Antalya province, Turkey. *Advances in Space Research*, 52(1), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2013.03.001>
- Kotarba, A. Z., Chacewicz, S., & Żmudzka, E. (2019). Night sky photometry over Warsaw (Poland) evaluated simultaneously with surface-based and satellite-based cloud observations. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 235, 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2019.06.024>
- McInnes B, Walker MF. (1974). Astronomical site testing in the Canary Islands. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific* 86(512), 529. <https://doi.org/10.1086/129641>
- Mekhair, S. A. (2017). Atmospheric conditions affecting seeing at St. Catherine: Estimation of operational time for NRIAG new telescope. *NRIAG Journal of Astronomy and Geophysics*, 6(1), 5-18. <https://doi.org/10.1016/j.nrjag.2017.04.005>
- MGM (2021a), Meteoroloji Genel Müdürlüğü, İstasyon Bilgileri Veritabanı, Erişim adresi: <http://www1.mgm.gov.tr/kurumsal/istasyonlarimiz.aspx>
- MGM (2021b), Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Resmi İstatistikler, Erişim adresi: <https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=ERZURUM>
- Sahin, S., & Cigizoglu, H. K. (2012). The sub-climate regions and the sub-precipitation regime regions in Turkey. *Journal of Hydrology*, 450, 180-189. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2012.04.062>
- Schöck, M., Els, S., Riddle, R., Skidmore, W., Travouillon, T., Blum, R., ... & Wang, L. (2009). Thirty Meter Telescope site testing I: overview. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 121(878), 384. <https://doi.org/10.1086/599287>
- Stöckli, Reto; Duguay–Tetzlaff, Anke; Bojanowski, Jędrzej; Hollmann, Rainer; Fuchs, Petra; Werscheck, Martin (2017): CM SAF CIOud Fractional Cover dataset from METeosat First and Second Generation - Edition 1 (COMET Ed. 1), Satellite Application Facility on Climate Monitoring, DOI:10.5676/EUM\_SAF\_CM/CFC\_METEOSAT/V001, [https://doi.org/10.5676/EUM\\_SAF\\_CM/CFC\\_METEOSAT/V001](https://doi.org/10.5676/EUM_SAF_CM/CFC_METEOSAT/V001)
- Toy, S., & Kántor, N. (2017). Evaluation of human thermal comfort ranges in urban climate of winter cities on the example of Erzurum city. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1811-1820. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7902-8>
- Vernin, J., Muñoz-Tuñón, C., Sarazin, M., Ramió, H. V., Varela, A. M., Trinquet, H., ... & Vrech, R. (2011). European extremely large telescope site characterization I: Overview. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 123(909), 1334. <https://doi.org/10.1086/662995>
- Yüzlükoğlu F. (2017). Erzurum ve çevresinin astronomi gözlemleri açısından atmosferik özellikleri (Yüksek Lisans tezi) Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye. Erişim adresi: [https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=OpplWVxFL0dH43qQV0BZrA&no=XPbubJZaAOZ1LkxNndac\\_A](https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=OpplWVxFL0dH43qQV0BZrA&no=XPbubJZaAOZ1LkxNndac_A)



## Edirne İlinde Yetişen Dut Ağacı Yapraklarının Antioksidan ve Antidiyabetik Aktivitesi Üzerine Bir Çalışma

Şebnem Selen İşbilir<sup>1\*</sup>, Ecren Çelik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kimya Bölümü, Fen Fakültesi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye

### Makale Tarihi

Gönderim: 08.01.2021

Kabul: 21.05.2021

Yayın: 20.09.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** – Dut yaprakları halk arasında çeşitli hastalıklarda geleneksel olarak kullanılan bir bitkidir. Bitkilerin gösterdikleri çok çeşitli biyolojik etkinlikleri içerdikleri bileşenlerden kaynaklanmakta olup, bitkinin fitokimyasal bileşimi ve biyolojik potansiyeli yetiştiği bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Bu çalışmada Edirne ilinde yetişen beyaz ve siyah dut ağacı yapraklarından elde edilen su ve etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin ve *in vitro* enzim inhibisyon testleri ile antidiyabetik kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Beyaz ve siyah dut ağacı yaprak ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı 35.08-47.57 µg gallik asit eşdeğeri/mg, flavonoid miktarı 18.40-46.25 µg rutin eşdeğeri/mg ve tanen miktarı 4.59-7.53 µg tannik asit eşdeğeri/mg aralıklarında tayin edildi. Antioksidan aktivite testlerinde 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikallerini gidermede (EC<sub>50</sub> sırasıyla 0.31 mg/mL ve 0.79 mg/mL) ve CUPRAC metodunda (9.1 µmol troloks eşdeğeri antioksidan kapasite-TEAC) siyah dut yapraklarının etanol ekstraktı yüksek aktivite gösterirken, beta-karoten ağartma metodunda beyaz dut yapraklarının etanol ekstraktı (EC<sub>50</sub> 0.47 mg/mL) daha iyi sonuç verdi. Dut yapraklarının sadece su ekstraktlarının metal iyonlarını şelatlama gücüne sahip olduğu görüldü. Antidiyabetik aktivite çalışmasında yaprakların su ekstraktları değişen oranlarda α-amilaz ve α-glukozidaz inhibisyonu gösterdi. Su ekstraktlarının karbonhidrat sindirim enzimleri üzerine potansiyel inhibitör etkisi göstermesi, ülkemizde besin olarak tüketilmeyen dut yapraklarının ilaç hammaddesi kaynağı olarak değerlendirilebileceğini; siyah dut yapraklarının ise antioksidan katkı amaçlı olarak kozmetik uygulamalarda kullanılmak üzere ekonomiye kazandırılabilirliğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler** – Antiradikalik aktivite, dut ağacı yaprağı, enzim inhibisyonu, fenolik madde, metal şelatlama

## A Study on Antioxidant and Antidiabetic Activities of Mulberry Leaves Which Grown in Edirne Province

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Trakya University, Edirne, Turkey

### Article History

Received: 08.01.2021

Accepted: 21.05.2021

Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** – Mulberry leaves are used traditional medicine in many diseases. The various biological activities of the plants are due to its chemical contents, therefore the phytochemical composition and biological potential of the plant vary according to the region where it grows. In this study, it was aimed to determine the antioxidant activity and antidiabetic potential using *in vitro* inhibition tests of leaves of white and black mulberry obtained from trees grown in Edirne. Total phenolic, flavonoid and tannin contents of leaves extracts were determined in the range of 35.08-47.57 µg gallic acid, 18.40-46.25 µg rutin and 4.59- 7.53 µg tannic acid equivalents, respectively. While ethanol extract of black mulberry leaves showed high activity in CUPRAC method (9.1 µmol TEAC), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radicals scavenging assays (EC<sub>50</sub> 0.31 mg/mL and 0.79 mg/mL, respectively), the ethanol extract of white mulberry leaves showed better carotene bleaching activity (EC<sub>50</sub> 0.47 mg/mL). Only water extracts of leaves were observed to have metal chelating capacity. In the antidiabetic activity study, the water extracts of leaves showed varying degrees of inhibition on α-amylase and α-glucosidase. The potential inhibitory effect of water extracts on carbohydrate digestive enzymes shows that mulberry leaves can be considered as a source of a drug candidate in the antidiabetic drug researches. Also black mulberry leaves can be used in cosmetic applications due to their antioxidant properties.

**Keywords** – Antiradical activity, mulberry tree leaf, enzyme inhibition, phenolic content, metal chelating

<sup>1</sup> sebnemselenisbilir@trakya.edu.tr

<sup>2</sup> ecren\_11\_93@hotmail.com

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Antioksidanlar serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı metabolizmanın korunmasını sağlayan endojen veya eksojen maddelerdir. Günümüzde serbest radikaller ve oksidatif stres; yaşlanma, katarakt, diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, çeşitli dokuların ve organların hasarı gibi birçok hastalık ile ilişkilendirildiği ([Dasgupta ve Klein, 2014](#); [Halliwell ve Gutteridge, 1990](#)) için metabolizmanın eksojen kaynaklı antioksidanlarca desteklenmesi önem kazanmıştır. Ayrıca lipid peroksidasyonunu önlemek üzere gıda sektöründe, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde de antioksidan etkili moleküller veya karışımlar kullanılmaktadır. Bu sektörlerce ve tüketiciler tarafından özellikle taze meyve ve sebzelerde bulunan doğal antioksidanlara karşı artan bir ilgi vardır. Bitkilerin antioksidan özellikleri polifenolik bileşikler, karotenoidler ve askorbik asit başta olmak üzere içerikleri fitobileşenlerden kaynaklanmaktadır. Başlıca fenolik asitler, flavanonlar, flavonlar, antosiyaninler, izoflavonlar, tanenleri kapsayan polifenolik bileşikler; bitkilerin sekonder metabolitleridir ve bitkilerin savunma mekanizması olarak birçok kısmında sentezlenirler ([Pietta, Minoggio ve Bramati, 2003](#)).

Günümüze kadar yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında meyve, sebze, baharat ve tıbbi bitkilerin çeşitli kısımları kullanılmıştır. Doğal antioksidan madde arayışında, incelenen antioksidan kaynağının etkili ve güvenilir olmasının yanında, son zamanlarda ucuz olması, kolay elde edilebilir olması ve atık bitkisel materyallerin değerlendirilmesi gibi özelliklere de sahip olması bir hedef haline gelmiştir. Bu sebeple meyveleri yenilebilen ancak yaprakları besin olarak kullanılmayan ağaçlar bu alandaki çalışmalarda yer almaktadır ([Gougoulis, 2015](#); [Liaudanskas vd., 2014](#); [Orak, Selen İsbilir ve Yagar, 2012](#); [Pontes vd., 2019](#); [Souza vd., 2020](#); [Zoral ve Turgay, 2014](#)).

Dut bitkisi Moraceae (Dutgiller) familyasından *Morus* cinsini oluşturan ağaç türleridir. Beyaz dut (akdut) ve siyah dut (karadut) olarak bilinen *Morus alba* ve *Morus nigra*'nın meyveleri sevilen bir yiyecek iken, yaprakları gıda olarak tüketilmemektedir. Beyaz dut ağacı meyvesi için, gölgesinden yararlanmak için ve yaprakları ipekböceği yetiştiriciliğinde kullanılmak üzere yetiştirilmektedir. Karadut eczacılıkta ilaçların tadını ve kokusunu değiştirmede, gıda sektöründe ise renk pigmenti olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde dut yaprakları geleneksel halk ilacı olarak da kullanılmaktadır. Dut yaprağından hazırlanan çay; halk arasında boğaz iltihaplarını tedavi etme, kuru öksürüğü giderme, egzama tedavisi, kan şekerini düşürme amaçlarıyla kullanılırken, karadut meyvelerinden elde edilen şurup ise yeni doğmuş bebeklerin ağızlarında oluşan pamukçuk tedavisinde kullanılmaktadır. Beyaz ve siyah dut yaprakları özellikle kan şekeri seviyesini düşürmek amaçlı ülkemizin çeşitli bölgelerinde kullanılmaktadır ([Tuzlacı ve Bulut, 2007](#); [Tuzlacı ve Sadıkoğlu, 2007](#); [Tuzlacı ve Şenkardes, 2011](#)). Uzakdoğu ülkelerinde ise özellikle Çin tıbbında dut ağacının yaprak ve dalları karaciğeri korumak, ateş ve kan basıncını düşürmek için kullanılırken, Tayland'da dut yaprağı çayı antidiyabetik bir içecek olarak tüketilmektedir. Bununla birlikte son zamanlarda Çin'de dut yaprakları sebze olarak günlük diyete eklendiği için, pek çok dut çeşidi besin ve fonksiyonel bileşenleri açısından da bilimsel araştırmaların konusu olmaktadır ([Xiao vd., 2020](#); [Yu vd., 2018](#)).

Diyabet hastalığında geleneksel halk ilacı olarak çeşitli bitkiler kullanılmaktadır ([Yatoo vd., 2017](#)). Ülkemizde kullanılanlardan bazıları kudret narı, banaba, çemen, gurmar, tarçın, ginseng türleri, zeytin yaprağı, kekik, iğde yaprağı, ardıç ve ısırgandır ([Aslan ve Orhan, 2010](#); [Tuzlacı ve Sadıkoğlu, 2007](#); [Tuzlacı ve Bulut, 2007](#)). Genellikle şeker hastalığı olarak bilinen Diabetes mellitus (DM), başta karbonhidrat metabolizması olmak üzere lipid ve protein metabolizmalarını da etkileyen; hiperglisemiyle karakterize, kronik, metabolik bir hastalıktır ([Sonia ve Sharma, 2014](#)). DM'nin tıbbi tedavi sürecindeki temel yaklaşımlardan biri  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz gibi karbonhidratları parçalayan enzimlerin inhibisyonunu sağlayarak, karbonhidrat emilimini azaltmaktır ([Çubuk ve İnce, 2015](#)). Bitkilerde yaygın olarak bulunan diyet polifenollerinin antioksidan kapasitelerinin yanında, sözü geçen bu sindirim enzimlerine karşı inhibitör etkilerinin de olduğu bildirilmiştir ([Xiao vd., 2013](#); [Asgar, 2013](#)). Literatürde farklı tür ve menşei dut yapraklarının antioksidan ve hipoglisemik etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur ([Anwar vd., 2015](#); [Hasim, Uci ve Didah, 2020](#); [He vd., 2020](#); [Iqbal vd., 2012](#); [Levickiene vd., 2017](#); [Thabti, Marzougui, Elfalleh ve Ferchichi, 2011](#); [Yu vd., 2018](#)). Bu



çalışmalar incelendiğinde; dut yapraklarıyla yapılan antioksidan aktivite çalışmalarının toplam fenolik madde ve flavonoid tayinlerinin yanında özellikle DPPH veya ABTS radikallerini giderme aktivitesi ile sınırlı oldukları görülmektedir. Ayrıca bitkinin türü ve cinsi gibi genetik faktörler; iklim, bitkinin yetiştirildiği bölge, toprak çeşidi gibi çevresel etkiler ve tarım uygulamalarına bağlı faktörler dolayısıyla çalışılan dut yapraklarının biyoaktif bileşen miktarları geniş bir aralıkta olabildiği için gösterdikleri biyolojik aktiviteler de farklı olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı sunulan bu çalışmada Edirne ilinde yetişen beyaz ve siyah dut yapraklarının *in vitro* antidiyabetik aktivitesinin ve antioksidan aktivitesinin incelenmesi hedeflenmiştir. Dut yapraklarının antioksidan aktivitesi beş farklı metod (DPPH• ve ABTS•<sup>+</sup> giderme gücü, β-karoten ağartma metodu, CUPRAC metodu, metal şelatlama kapasitesi) kullanılarak kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiş ve ekstraktlarda toplam fenolik madde, flavonoid madde ve tanen miktar tayinleri de yapılmıştır. Yapılan çalışma ile Edirne yöresinde yetiştirilen bu iki dut ağacı türünün yaprakları, içerdiği fitobileşenler ve antioksidan potansiyelleri açısından kıyaslanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Musabeyli Köyü (Edirne)'nde yetişmiş olan beyaz ve siyah dut ağacı yaprakları yerel halk pazarından (Haziran, 2017) satın alındı. Kullanılan kimyasal maddeler Sigma-Aldrich ve Riedel-de Haen firmalarından satın alınmış olup, hepsi analitik saflıktadır.

### 2.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Yapraklar laboratuvarında direk güneş ışığı almayan, aydınlık ve havadar bir ortamda kurutulduktan sonra Waring blenderde öğütüldü. Kurutulmuş ve parçalanmış olan beyaz ve siyah dut yapraklarının üzerine örnek:çözücü oranı 1:25 (w/v) olacak şekilde etanol (%80) eklendi. Toplam 6 saat 25°C'de 180 rpm çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyonları yapıldı. Süzüldükten sonra çözücüsü evapore edildi. Su ekstraktlarının hazırlanması için siyah ve beyaz dut yapraklarına örnek:çözücü oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde saf su eklenerek, ağzı kapalı halde 15 dk ısıtıcıda 80°C'de ısıtıldı. Süzüldükten sonra örnekler liyofilize edildi. Deneylerde, elde edilen bu ham ekstraktlar kullanıldı. Tüm denemeler iki kez tekrarlandı ve her seferinde ikişer paralel örnek çalışıldı.

### 2.2. Fitobileşen Miktarının Tayini

Fenolik madde, flavanoid ve tanen miktar tayinleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak [Singleton ve Rossi'nin \(1965\)](#) metoduna göre yapıldı. 100 µL (1 mg/mL) örnek üzerine 4.5 mL destile su, 100 µL FCR eklendi. Vortekste çalkalandıktan sonra 300 µL %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi ve iki saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Spektrofotometrede 760 nm'de absorpsanları ölçüldü. Standart fenolik madde olarak 50-500 µg/mL konsantrasyon aralığındaki gallik asit çözeltileri kullanıldı.

Toplam flavonoid tayininde AlCl<sub>3</sub> ile örneklerin şelat oluşturması esasına dayanan metod kullanıldı ([Zhishen, Mengcheng ve Jianming, 1999](#)). Etanol ve su ekstraktı örneklerinden 0.1 mL alınarak, hacimleri destile su ile 2.5 mL'ye tamamlandı. Üzerlerine 75 µL %5 NaNO<sub>2</sub> eklendikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 150 µL %10'luk AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O eklenip 6 dk oda sıcaklığında bekletildi. 0.5 mL 1 M NaOH eklenerek vortekslendi ve oluşan pembe renkli komplekslerin absorpsanları 510 nm'de ölçüldü. Standart flavonoid olarak 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığındaki rutin çözeltileri kullanıldı.

Tanen tayini için; 100 µL (1 mg/mL) örnek üzerine 500 µL Folin-Denis reaktifi ve 1 mL doymuş Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklendi. Toplam hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandıktan sonra 30 dk bekletildi ve λ=700 nm'de absorpsanları ölçüldü ([Katoch, 2011](#)). Standart olarak 10-70 µg/mL konsantrasyon aralığındaki tannik asit çözeltileri kullanıldı.

### 2.3. Antioksidan Aktivite Testleri

DPPH ve ABTS süpürme metodları kullanılarak örneklerin serbest radikal süpürme kapasiteleri belirlendi. Blois'in metoduna ([Blois, 1958](#)) göre çalışılan DPPH radikal süpürme aktivitesinde farklı konsantrasyonlarda (100-1000 µg/mL) hazırlanan örnek veya standart madde (BHA, bütillenmiş hidroksi anisol) çözeltilerine 0.1 mM DPPH çözeltisi eklendi ve 30 dakika oda koşullarında karanlıkta bekletildi, 517 nm'de absorbansları okundu. Örnek yerine etanol veya su kullanılarak kontrol tüpü hazırlandı. Denklem 2.1 kullanılarak standartların ve örneklerin serbest radikal giderme etkinlikleri % inhibisyon olarak hesaplandı.  $A_{\text{Kontrol}}$  kontrol tüpünün absorbansını ve  $A_{\text{Örnek}}$  örnek veya standartın absorbansını göstermektedir.

$$\%I = [ (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}} ] \times 100 \quad (2.1)$$

ABTS radikal süpürme aktivitesi deneyinde, ABTS çözeltisi ve sodyum persülfat çözeltisi 1:0.5 oranında karıştırılarak 16 saat bekletildi ve ABTS radikalinin ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) oluşumu sağlandı. Hazırlanan çözeltinin absorbansı etanolle seyreltilerek 734 nm'de 0.70 absorbans verecek hale getirildikten sonra kullanıldı. ABTS radikal çözeltisi eklenen örnek (100-1000 µg/mL) veya standart madde (BHT, bütillenmiş hidroksi toluen) çözeltileri 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra 734 nm'de absorbansları ölçüldü ([Re vd., 1999](#)). Denklem 2.1'deki formül kullanılarak radikal giderme oranları hesaplandı.

Dut yaprağı ekstraktlarına β-karoten ağartma yöntemi uygulanarak ekstraktların lipid peroksidasyonunu önleme yetenekleri incelendi ([Miller ve Luiz-Larrea, 2002](#)). 100-1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerle, β-karoten ve linoleik asitten oluşan substrat emülsiyonu eklendi.  $\lambda=490$  nm'de ilk absorbansları ( $t_0$ ) ölçüldü. Mikroplakalar etüvde 50 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra absorbansları ( $t_{120}$ ) tekrar ölçüldü. Sentetik antioksidan BHT ile deney tekrarlandı. Tüm örnekler için denklem 2.2 ve 2.3'te verilen formüller ile hesaplamalar yapılarak, ortamda oluşturulan lipid peroksidasyonunu engelleme oranları % inhibisyon olarak hesaplandı.

$$R = [ \ln(A_{t_0} / A_{t_{120}}) ] / t \quad (2.2)$$

$$\beta\text{-Karoten ağartma oranı (\%I)} = [ (R_{\text{Kontrol}} - R_{\text{Örnek}}) / R_{\text{Kontrol}} ] \times 100 \quad (2.3)$$

Denklem 2.2'deki t inkübasyon süresini;  $A_{t_0}$  örneklerin inkübasyondan önceki ilk absorbans ölçümünü;  $A_{t_{120}}$  örneklerin inkübasyondan sonraki absorbans ölçümünü; R β-karotenin bozunma oranını ifade etmektedir.

Beyaz ve siyah dut yaprağı ekstraktlarının antiradikal aktivite ve lipid peroksidasyonunu önleme sonuçları  $EC_{50}$  değeri olarak verildi.  $EC_{50}$  (etkin konsantrasyon) değeri ortamdaki radikalın yarısını gidermek için gerekli olan ekstrakt miktarı olarak tanımlanmakta olup, ekstrakt konsantrasyonuna karşı inhibisyon grafikleri çizilerek hesaplanmaktadır.  $EC_{50}$  faktörü antioksidan aktiviteyi değerlendirmede en sık kullanılan parametredir ([Molyneux, 2004](#)).

Ekstraktların toplam antioksidan aktivite tayini CUPRAC (Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi ile çalışıldı ([Apak, Güçlü, Özyürek ve Karademir, 2004](#)). Mikroplaka kuyucuklarına eşit hacimde (50 µL)  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , neokuproin ve amonyum asetat tampon (pH=7.0) çözeltileri konuldu. Üzerlerine her bir ekstraktan (50-750 µg/mL) eklendikten sonra su ile belirlenen toplam hacme (205 µL) tamamlandı ve 30 dk karanlıkta bekletildi.  $\lambda=450$  nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Ekstraktlar yerine alkol veya saf su konularak kontrol çalışıldı. Standart antioksidan (BHT) için de aynı deney prosedürü uygulandı. Antioksidan özellik gösteren çeşitli bileşiklerin antioksidan güçleri, troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) olarak verilmektedir.  $TEAC_{\text{CUPRAC}}$  değerlerini bulmak için test edilen bileşiğin ve troloksun konsantrasyon-absorbans grafikleri çizildi ve grafiklerin eğimleri birbirine oranlandı (Denklem 2.4) ([Apak vd., 2004](#)).



$$TEAC_{CUPRAC} = E_{\text{gim}}^{\text{Örnek}} / E_{\text{gim}}^{\text{Troloks}} \quad (2.4)$$

Metal şelatlama aktivitesi tayininde dut yaprağı ekstraktlarının  $Fe^{+2}$  iyonlarını şelatlama kapasitesi Dinis ve arkadaşlarının açıkladığı prosedüre göre çalışıldı (Dinis vd., 1994). Dut yaprağı su ve etanol ekstraktları 25-1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında hazırlandı. Örnekler  $FeCl_2$  çözeltisi eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra ortama demir iyonu ile pembe renkli kompleks yapan ferrozin çözeltisi eklendi ve 10 dk bekletildikten sonra 562 nm'de absorbansları ölçüldü. Ekstrakt eklenmeden kontrol tüpü hazırlandı. Bu metodda düşük absorbans değerleri, yüksek demir iyonu şelatlama gücünü ifade etmektedir. Örneklerin metal giderme kapasiteleri Denklem 2.5 kullanılarak % olarak hesaplandı.

$$\text{Metal şelatlama oranı (\%)} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}}] \times 100 \quad (2.5)$$

#### 2.4. Antidiyabetik Aktivite Testleri

Örneklerin antidiyabetik etkisini belirlemek üzere Apostolidis ve ark. önerdiği metod kullanıldı (Apostolidis, Kwon ve Shetty, 2007). Deney tüpüne 0.5 mL %0.1'lik nişasta ve 0.1 mL amilaz enzimi (3.0 U, domuz pankreatik kaynaklı) alınarak 25 °C'de 15 dk inkübe edildi. 3,5-dinitro salisilik asit (DNS) reaktifi eklenerek 5 dk kaynatıldı. Tüpler soğutulduktan sonra 550 nm'de absorbansları ölçüldü. Enzim yerine tampon alınarak şahit numune tüpü çalışıldı.

Ekstraktların  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerinde inhibe edici etkisinin olup olmadığını incelemek için; öncelikle ekstraktlar (1.0, 2.5, 5.0 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda) ve amilaz enzimi 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Daha sonra yukarıdaki prosedür uygulandı. Ayrıca her bir örnek için enzim yerine tampon konularak numune körleri çalışıldı. Ekstrakt eklenmeden enzim aktivitesi ölçülen tüp %100 aktif kabul edildi. Denklem 2.6 kullanılarak örneklerin  $\alpha$ -amilaz enzimini inhibe etme oranları hesaplandı. Denklemde  $A_{\text{Amilaz}}$  %100 aktif kabul edilen tüpün absorbansı;  $A_{\text{Ekstrakt}}$  örneklerin absorbanslarından, numune körü absorbansları çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerini ifade etmektedir.

$$\text{Amilaz inhibisyonu (\%)} = [(A_{\text{Amilaz}} - A_{\text{Ekstrakt}}) / A_{\text{Amilaz}}] \times 100 \quad (2.6)$$

$\alpha$ -Glukozidazın aktivite tayininde substrat olarak p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranosid (p-NPG) ve enzim çözeltisi (0.2 U, *Saccharomyces cerevisia* kaynaklı  $\alpha$ -glukozidaz) karıştırılarak 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. 0.1 M  $Na_2CO_3$  çözeltisi eklendikten sonra 405 nm'de absorbansları okundu (Apostolidis, Kwon ve Shetty, 2007).

Ekstraktların  $\alpha$ -glukozidaz enzimi üzerinde inhibe edici etkisinin olup olmadığını incelemek için; 1.0, 2.5, 5.0, 10 mg/mL'lik konsantrasyonlardaki ekstraktlar enzim ile 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Daha sonra yukarıdaki gibi  $\alpha$ -glukozidaz aktivite tayin prosedürü uygulandı. Enzim yerine tampon konularak ekstraktların numune körleri çalışıldı. Ekstraktların  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon değerleri denklem 2.7'deki formül ile % inhibisyon olarak hesaplandı.  $A_{\text{Glukozidaz}}$  %100 aktif kabul edilen tüpün absorbansı;  $A_{\text{Ekstrakt}}$  örneklerin absorbanslarından numune körü absorbansı çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerini ifade etmektedir.

$$\text{Glukozidaz inhibisyonu (\%)} = [(A_{\text{Glukozidaz}} - A_{\text{Ekstrakt}}) / A_{\text{Glukozidaz}}] \times 100 \quad (2.7)$$

### 3. Bulgular ve Tartışma

Bitkilerin gösterdikleri biyolojik aktiviteleri ve sağlık üzerindeki etkileri içerdikleri başta fenolik bileşikler olmak üzere diğer biyoaktif metabolitlere atfedildiği için, öncelikle elde edilen ham ekstraktların toplam fenolik bileşik, flavonoid ve tanen miktarları belirlendi. Dut yaprağı ekstraktlarının fenolik madde içeriği bitkilerde en yaygın olarak bulunan gallik asit eşdeğeri olarak; flavonoidler geniş bir çeşitlilik gösterdiğinden flavonoid içeriği bir flavonol glikozidi olan rutin eşdeğeri olarak ve tanen miktarı ise hidrolizlenebilen tanenlerden en sık bulunan tannik asit eşdeğeri olarak hesaplandı (Tablo 1).

Tablo 1.  
Dut yapraklarının su ve etanol ekstraktlarının fitobileşen içerikleri

Ekstrakt/ Çözücü	Kısaltma	Toplam Fenolik <sup>1</sup> µg GAE/mg	Toplam Flavonoid <sup>2</sup> µg RE/mg	Tanen <sup>3</sup> µg TAE/mg
Beyaz Dut Yaprağı/Su	B-Su	47.57±0.21	40.97±0.11	4.59±0.29
Beyaz Dut Yaprağı/Etanol	B-EtOH	35.08±0.16	19.64±0.08	6.05±0.48
Siyah Dut Yaprağı/Su	S-Su	47.22±0.24	46.25±0.14	5.15±0.68
Siyah Dut Yaprağı/Etanol	S-EtOH	37.69±0.42	18.40±0.07	7.53±0.54

<sup>1</sup>Gallik asit eşdeğeri olarak, <sup>2</sup>Rutin eşdeğeri olarak ve <sup>3</sup>Tannik asit eşdeğeri olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar 2 deneyin ortalaması ± standart sapma olarak verilmiştir.

Çalışmada siyah ve beyaz dut yapraklarının su ekstraktlarındaki (S-Su ve B-Su) fenolik madde miktarları etanol ekstraktlarından (S-EtOH ve B-EtOH) daha yüksektir. Siyah ve beyaz dut yapraklarının su ekstraktlarındaki toplam flavonoid miktarları, etanol ekstraktlarındakinin yaklaşık iki katı kadardır. Tanen miktarları birbirine yakın olmakla birlikte, 4.59-7.53 µg TAE/mg aralığındadır. Elli çeşit dut yaprağının %70'lik etanol ekstraktlarındaki tanen dağılımı 0.45-1.49 g/100 g olarak bildirilmiştir (Xiao vd., 2020). He vd. (2020) 12 çeşit dut yaprağının %50'lik etanol ekstraktlarında fenolik madde içeriğini 11.49-30.03 mg GAE/g ve flavonoid içeriğini de 24.24-58.42 mg RE/g aralığında belirlemişlerdir. Diğer bir çalışmada da 19 çeşit dut yaprağının %80'lik metanol ekstraktları için fenolik madde içeriği 8.76-20.26 mg GAE/g ve flavonoid içeriği ise 21.36-56.41 mg RE/g olarak tayin edilmiştir (Yu vd., 2018). Çalışmamızda tayin edilen flavonoid miktarları bu çalışmaların sonuçlarına yakın iken, toplam fenolik miktarları biraz daha yüksek değerlerdedir. Chon vd. (2009) beyaz dut (*Morus alba* L.)'un kök, yaprak, dal ve meyvesi ile yaptıkları çalışmalarında, en yüksek fenolik madde miktarının bitkinin kök ve yaprak kısımlarında olduğunu ifade etmişlerdir. Elde edilen metanolik ekstraktlarda toplam fenolik sıralamasını kg başına mg ferulik asit eşdeğeri cinsinden kök (117.7±2.0) > yaprak (71.4±2.4) > dal (49.0±1.5) > meyve (11.2±0.3) olarak bildirmişlerdir.

Dut ağacının farklı bölgelerde yetişmesi, ağacın türü, yaprağın toplanma zamanı ve olgunluk derecesi bitkinin biyobileşen içeriğini önemli ölçüde etkilemektedir. Ayrıca taze veya kurutulmuş örneklerle çalışılması, ekstraksiyon yöntemi ve çözücüsü de ekstrakta geçen fitobileşen içeriğini ve dolayısıyla ekstraktın göstereceği biyolojik aktiviteyi etkilemektedir. Zhishen vd. (1999) ilkbaharda (Mayıs, 11.7-26.6 µg rutin ekivalenti/g) toplanan dut yapraklarının flavonoid miktarlarının sonbaharda (Kasım, 9.84-23.4 µg rutin ekivalenti/g) toplananlardan daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmalarında taze yapraklar ile etüvde veya oda koşullarında kurutulmuş yaprakların flavonoid miktarlarının da farklı olduğunu belirtmişlerdir. He vd. (2020) genç yaprakların fenolik ve flavonoid içeriğinin olgun yapraklardan daha yüksek olduğunu ve daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiklerini bildirmiştir. Fenolik ve flavonoid içeriğinde gözlenen bu farklılıklar çözücü ve ekstraksiyon proseslerinin çeşitliliğinden kaynaklanabileceği gibi, miktar tayini için kullanılan standart maddelerin farklı olması da çalışmaların kıyaslanmasını zorlaştırmaktadır.

Gıda, bitki ekstraktları ve biyolojik sistemlerin antioksidan kapasitelerini değerlendirmek için çeşitli *in vitro* metodlar kullanılmaktadır. Bu metodlar kullanılan substratın cinsi ve özelliği, oksidasyon şartları, test ortamının heterojenitesi gibi birçok faktörden etkilenmektedir ve dolayısıyla antioksidan kapasiteyi belirleyebilmek için kullanılabilecek standart bir tek metod yoktur. Bu yüzden gıda veya bitki ekstraktının antioksidan aktivitesini belirlemek için birden fazla metod kullanılmaktadır. Bu çalışmada da dut yaprağı ekstraktlarının serbest radikal süpürme etkinliğini belirlemek için DPPH ve ABTS radikallerini giderme metodları kullanıldı. CUPRAC ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemleri ile toplam antioksidan kapasiteleri belirlendi. Geçiş metalleri reaktif oksijen türlerinin oluşumunda rol oynadığı için örneklerin metal şelatlama aktivitesi de değerlendirildi.

Çalışmamızda siyah dut yaprağı, özellikle alkol ekstraktı, serbest radikal gideriminin ölçüldüğü iki metotta da beyaz dut yaprağından daha iyi sonuç vermiştir (Tablo 2). Her iki dut yaprağı etanol ekstraktlarının DPPH radikalini süpürme etkinliği konsantrasyona bağlı olarak artmakla birlikte, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve üzerindeki konsantrasyonlarda daha yüksek olarak gözlenmiştir. Ayrıca siyah dut yaprağı etanol ekstraktının ( $\text{EC}_{50}=0.31$   $\text{mg}/\text{mL}$ ) DPPH' giderme gücünün, sentetik antioksidan BHA ( $\text{EC}_{50}=0.24$   $\text{mg}/\text{mL}$ ) ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu görülmektedir. Chon vd. (2009) dut bitkisinin (*Morus alba* L.) farklı kısımlarıyla yaptıkları çalışmada DPPH serbest radikalini giderme deneyinde 1000  $\mu\text{g}/\text{g}$  konsantrasyonda en yüksek aktiviteyi yaparak (%70), dal ve kökten elde edilen metanol ekstraktlarında; en düşük aktiviteyi ise %35 inhibisyon oranı ile meyve metanol ekstraktında tayin etmişlerdir. Çalışmamızda DPPH giderme oranı 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonda beyaz dut yaprağı etanol ekstraktında %83.16 $\pm$ 0.16, su ekstraktında ise %56.02 $\pm$ 2.84 olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.

Siyah ve beyaz dut yaprağı ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri

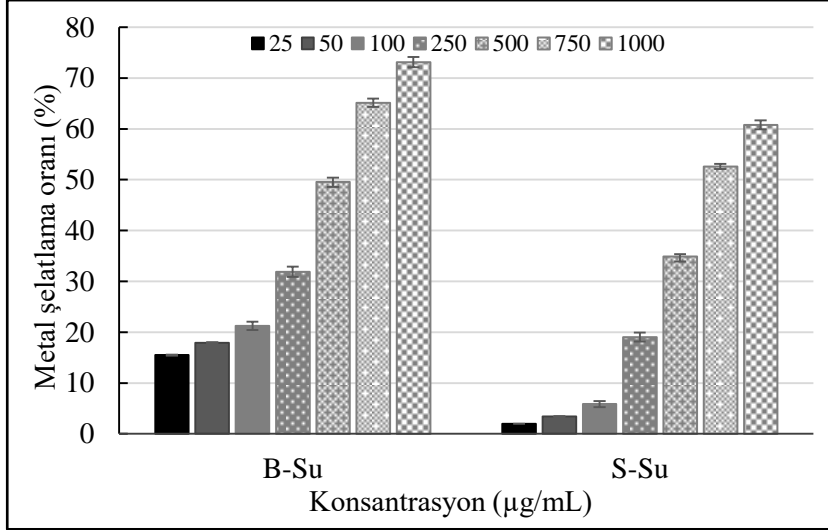
	DPPH <sup>*</sup> giderme ( $\text{EC}_{50}$ $\text{mg}/\text{mL}$ )	ABTS <sup>++</sup> giderme ( $\text{EC}_{50}$ $\text{mg}/\text{mL}$ )	Karoten ağartma ( $\text{EC}_{50}$ $\text{mg}/\text{mL}$ )	CUPRAC ( $\mu\text{mol TEAC}$ )
B-Su	0.53	0.83	-	5.5 $\pm$ 0.12
B-EtOH	0.52	0.84	0.47	8.7 $\pm$ 0.08
S-Su	0.415	0.83	-	6.5 $\pm$ 0.07
S-EtOH	0.31	0.79	0.72	9.1 $\pm$ 0.11
Sentetik Antioksidan	0.24 (BHA)	0.05 (BHT)	0.03 (BHT)	52.6 $\pm$ 0.24 (BHT)

100-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlanan her bir dut yaprağı örneklerinin antiradikal etkinliği ABTS<sup>++</sup> giderme metodu ile de çalışıldı. Artan konsantrasyonla birlikte radikal giderme etkinliğinde artış olmasına rağmen, tüm örneklerde en yüksek inhibisyon oranları en yüksek konsantrasyonda gözlemlendi. Tablo 2'de verilen  $\text{EC}_{50}$  değerlerine göre ABTS radikalini gidermede en etkili örneğin, 0.79  $\text{mg}/\text{mL}$   $\text{EC}_{50}$  değeri ile siyah dut yaprağı etanol ekstraktının olduğu görülmektedir. Benzer şekilde Anwar vd. (2015) de dört tür dut yaprağından *Morus nigra* (siyah dut) yapraklarının güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. He vd. (2020) 12 çeşit dut yaprağı ile yaptıkları araştırmada, DPPH ve FRAP antioksidan metodlarından elde ettikleri verilere göre, bazı kültürlerin daha yüksek aktivite gösterdiğini ve genel olarak da flavonoid ve fenolik miktarı yüksek olan dut yapraklarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Dutun meyvesiyle de çalışılmıştır; Gündoğdu vd. (2011) üç tür dut meyvesiyle yaptıkları ABTS radikali giderme çalışmasında, koyu renkli dutların açık renkli dutlardan daha yüksek TEAC değeri olduğunu bildirmişlerdir. Dut meyvesiyle ilgili başka bir çalışmada ise DPPH radikali, süperoksit ve hidroksil radikallerini giderme etkinlikleri çalışılmış ve genel olarak etanol ekstraktlarının 400  $\mu\text{g}$  ve üzerindeki miktarlarda iyi derecede DPPH' süpürme etkinliği olduğu bildirilmiştir (Bae ve Suh, 2007).

Ekstraktların toplam antioksidan aktivitesi  $\beta$ -karoten/linoleik asit model sistemi kullanılarak değerlendirildi. Yöntemin temeli ısı etkisiyle linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan peroksitlerin inhibisyonunun ölçülmesi esasına dayanır. Bu metotta tüm örnekler 100-1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında çalışılmış ve su ekstraktlarından elde edilen sonuçların %40 inhibisyon oranının altında olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu sonuç deneysel ortamda oluşturulan lipid peroksidasyonunu önlemede, siyah ve beyaz dut yapraklarının su ekstraktlarının yeterince etkili olmadığını işaret etmektedir. Bu durum; diğer metodlara göre daha apolar karakterli olan test ortamında, su (1.00) ve etanol (0.65) çözücülerinin polaritelerinin farklı olması ve bu sebeple etanol ekstraktından daha fazla etki alınmış olmasıyla açıklanabilir. Alkol ekstraktları, su ekstraktlarına göre daha iyi olmakla birlikte 500  $\mu\text{g/mL}$  ve üzerindeki konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu önlemede etkili olmuşlardır. Konsantrasyon-% inhibisyon grafiklerinden bulunan  $\text{EC}_{50}$  değerleri beyaz dut yaprağının etanol ekstraktı için 0.47  $\text{mg/mL}$  ve siyah dut yaprağının etanol ekstraktı için 0.72  $\text{mg/mL}$  olarak hesaplanırken, sentetik antioksidan BHT için ise 0.03  $\text{mg/mL}$  olarak hesaplanmıştır (Tablo 2). Literatürde eritrosit membran modeli (Andallu, Shankaran, Ullagaddi ve Iyer, 2014) ve amonyum tiyosiyanat yöntemi (Anwar vd., 2015) olarak bilinen farklı metodlar kullanılarak dut yapraklarının lipid peroksidasyonunu önlemesine dair yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Anwar vd. 'nin araştırmasında çalışılan dört tür (*M. alba*, *M. nigra*, *M. macroura* Miq ve *M. laevigata* W.) dut ekstraktının yüksek oranlarda (%60.23-88.51) aktivite gösterdiği, Andallu vd. 'nin çalışmasında ise *Morus indica* L. yaprak ekstraktının eritrosit membran modelinde oluşturulan lipid peroksidasyonunu ve hidroperoksidlerin oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Hasim, Uci ve Didah (2020) *M. alba* L. (beyaz dut) yaprağı etanol ekstraktının, ısıyla indüklenen linoleik asit oksidasyonunu önleme gücünü TBA (tiyobarbütirik asit) metodu ile tayin etmişler ve çalıştıkları konsantrasyonlarda %36-45.3 inhibisyon oranlarına ulaşmışlardır.

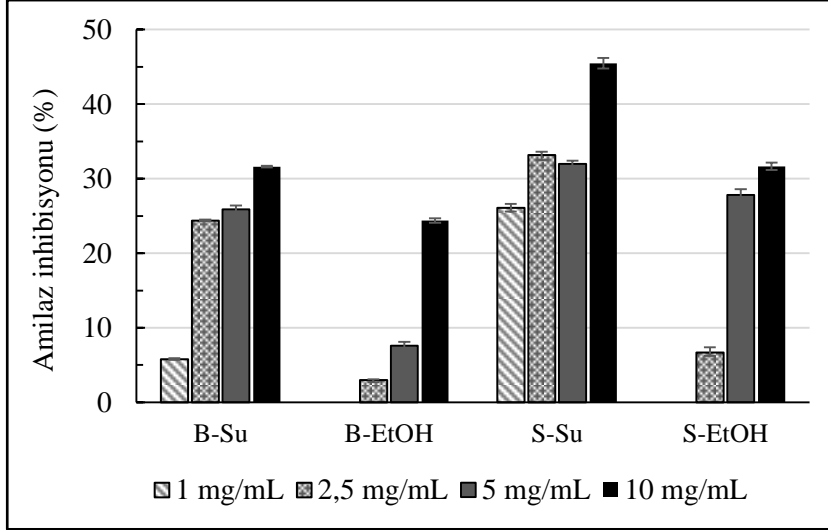
Toplam antioksidan kapasitenin ölçümü; hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara daha iyi cevap verebilen ve daha kararlı olan CUPRAC deneyi kullanılarak da değerlendirildi. Bu metotta örneklerin kuprik iyonunu, kupröze indirgeme kapasiteleri troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) olarak verilmekte ve büyük TEAC değeri yüksek antioksidan kapasiteyi ifade etmektedir. Karoten ağartma metodu ile yapılan toplam antioksidan aktivite tayinine benzer şekilde; her iki dut çeşidi için de alkol ekstraktlarından elde edilen sonuçlar su ekstraktlarına göre daha yüksek bulundu (Tablo 2).

Hidrojen peroksit, geçiş metalleri arasında özellikle  $\text{Fe}^{+2}$  varlığında en reaktif tür olan hidroksil radikalinin oluşumuna yol açar. Bu yüzden geçiş metallerinin şelatlanması lipid peroksidasyon sürecinin önlenmesi veya geciktirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Uygulanan metod  $\text{Fe}^{+2}$  iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile örnekte bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışması esasına dayanır. Örnek tarafından  $\text{Fe}^{+2}$ /ferrozin kompleksinin oluşumunun engellenmesi yani düşük absorban okunması örneğin metal şelatlama gücü olduğunun göstergesidir. Çalışmamızda siyah ve beyaz dut yaprağı su ekstraktları etanol ekstraktlarından daha iyi metal şelatlama yapmıştır ve bu ekstraktlarda metal şelatlama gücünde konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmiştir. Ancak çalışılan tüm konsantrasyonlarda, alkol ekstraktlarının metal şelatlama oranları %15'in altında kalmıştır (grafikte gösterilmedi). En yüksek aktivite beyaz dut yaprağının su ekstraktında (B-Su) görülmüştür (Şekil 1). Fenolik bileşiklerden antosiyaninlerin metal şelatlama gücü olmadığı, ancak polifenolik bileşikler ve özellikle flavonoidlerin metal şelatlama kapasitesinin olduğu rapor edilmiştir (Brouillard ve Dangles, 1993). Çalışmamızda her iki dut türünün de su ekstraktlarının metal şelatlama gücünün alkol ekstraktlarından daha iyi olması; su ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid miktarlarının alkol ekstraktlarına göre daha yüksek olmasından kaynaklanabilir.

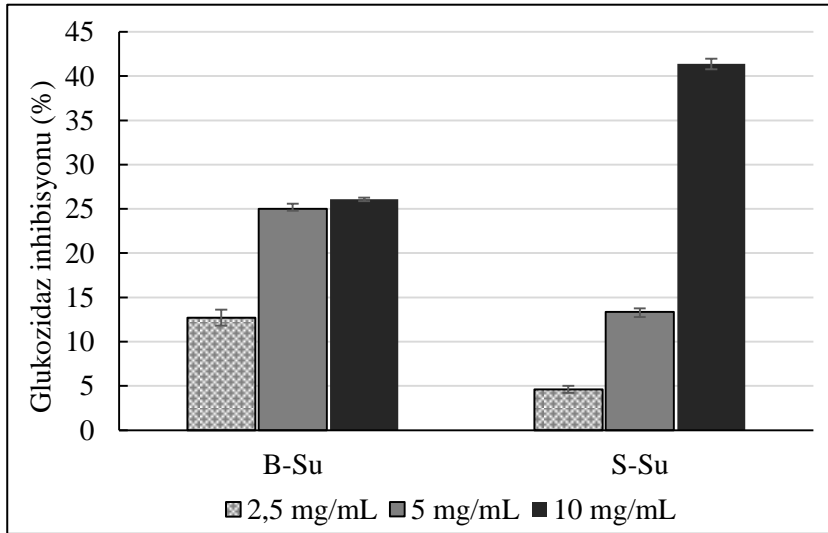


Şekil 1: Siyah ve beyaz dut yaprağı su ekstraktlarının metal şelatlama oranları (%) (Değerler 2 deneyin ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir)

Diyabet tedavisinde en önemli terapötik yaklaşımlardan birisi yemek sonrası (postprandial) hiperglisemiyi düşürmektir. Bu da sindirim kanalında karbonhidratları hidrolizleyen  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla karbonhidrat emilimini engelleyerek yapılmaktadır.  $\alpha$ -Glukozidaz inhibitörleri günümüzde oral antidiyabetik ajan olarak kullanılmaktadır ([Artuluk ve Ezer, 2012](#)), ancak yan etkileri olmayan ve doğal kaynaklı inhibitör arayışı da devam etmektedir. Dut kan şekerini düşürmek amaçlı halk ilacı olarak kullanıldığı için ([Tuzlacı ve Sadıkoğlu, 2007](#); [Tuzlacı ve Bulut, 2007](#)), dut ağacının farklı kısımlarıyla ilgili olarak dutun hipoglisemik etkisini incelemeye yönelik *in vivo* çalışmalar mevcuttur ([Bondada, Venkat ve Nallanchakravarthula, 2014](#); [Jozefczuka vd., 2017](#)), dut yaprağıyla ilgili olarak deneysel diyabet yapılmış sıçanlarda *Morus alba* (beyaz dut) yapraklarının ekstraktlarının hipoglisemik etkisi incelenmiştir ([Madalageri vd., 2016](#); [Mohammadi ve Naik, 2012](#)). Çalışmamızda dut yapraklarının antidiyabetik kapasitesini değerlendirmek üzere; su ve etanol ekstraktlarının dört konsantrasyonunda çalışılarak *in vitro*  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon testi yapılmıştır. Her iki enzim için de; dut yapraklarının su ekstraktlarının alkol ekstraktlarından daha yüksek oranda enzimleri inhibe ettiği görüldü.  $\alpha$ -Amilaz enzimini siyah dut yaprağının etanol ekstraktı (S-EtOH) en yüksek  $31.65 \pm 0.48$  oranında inhibe ederken, su ekstraktı (S-Su)  $45.48 \pm 0.42$  oranında inhibe etmiştir ([Şekil 2](#)). Beyaz dut yaprağının su ekstraktında (B-Su), artan konsantrasyon ile inhibisyon oranı artmasına rağmen en fazla  $31.61 \pm 0.12$  oranında inhibisyon gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz,  $\alpha$ -amilaz enzimini 1 mg/mL konsantrasyonda bile  $76.77 \pm 5.22$  oranında inhibe etmiştir.



Şekil 2: Siyah ve beyaz dut yaprağı ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz % inhibisyon oranları (Değerler 2 deneyin ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir)



Şekil 3: Siyah ve beyaz dut yaprağı ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz % inhibisyon oranları (Değerler 2 deneyin ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir)

Dut yapraklarının etanol ekstraktları çalışılan konsantrasyonlarda  $\alpha$ -glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermezken, siyah dut yaprağının su ekstraktı (S-Su) 10 mg/mL konsantrasyonunda glukozidaz enzimini  $41.36 \pm 0.65$  oranında inhibe etmiştir.  $\alpha$ -Glukozidaz inhibitörü olarak kullanılan akarbozun inhibisyon oranı 1 mg/mL konsantrasyonda  $52.83 \pm 2.15$ 'tir. [Hasim, Uci ve Didah \(2020\)](#) da çalışmalarında beyaz dut yaprak ekstraktının  $309.8 \mu\text{g/mL}$   $\text{IC}_{50}$  değeri ile akarbozdan ( $\text{IC}_{50} 0.25 \mu\text{g/mL}$ ) çok düşük oranda inhibisyona yol açtığını belirtmiştir. Antidiyabetik aktivite çalışmasından elde edilen sonuçlar, örneklerin su ekstraktlarının alkol ekstraktlarından daha yüksek enzim inhibisyonuna yol açtığını göstermektedir. Bu, amilaz ve glukozidaz enzimlerini inhibe eden biyoaktif metabolitlerin etanolden çok su ekstraktına geçtiğini işaret etmektedir. Çalışmamızda beyaz ve siyah dut yapraklarının su ekstraktlarındaki toplam fenolik ve flavonoid bileşenleri etanol ekstraktlarından daha yüksek miktarda tayin edilmiştir ([Tablo 1](#)). Dut yaprakları rutin, kersetin, izokersetin ve diğer flavonoidleri içermektedir ([Zhishen vd., 1999](#)). Dut ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi içerdiği fenolik ve flavonoid bileşenlerine ek olarak, dut yapraklarında bulunan 1-deksinojirimisin (DNJ) ([Hu vd., 2013](#)) ve moracin ([Tu vd., 2019](#)) gibi diğer biyoaktif bileşenlerden kaynaklanabilir. [Jozefczuka vd., \(2017\)](#) dut yaprağında yüksek oranda bulunan bir iminoşeker türevi



olan 1-deoksinojirimisinini nişasta sindirimini ve absorpsiyonunu azalttığını bildirmiştir. [Liu vd. \(2015\)](#) *M. alba* cinsi dutun dokuz farklı kısmından (genç sürgünler, yaprak, meyve, dalın kabuğu, ağaç gövdesi kabuğu, kök kabuğu, dalın odun kısmı, gövdenin odun kısmı ve kökün odun kısmı) hazırladıkları ekstraktlarda 1-deoksinojirimisin miktar tayinini yaparak, bu bileşiğin ekstraktların  $\alpha$ -glukozidaz üzerine inhibisyon aktivitesini araştırmıştır. DNJ bileşiğinin ağaç gövdesi kabuğu, kök kabuğu, yaprak ve genç sürgün ekstraktlarında diğer kısımlara göre daha yüksek olduğunu, yaprak ve genç sürgünlerin  $\alpha$ -glukozidaz üzerinde yarışmalı tip inhibisyon yaptığını bildirmişlerdir.

Elde edilen sonuçlara göre her iki tür dut yaprağının su ekstraktlarıyla karbonhidrat sindirimiyle ilişkili enzimlerin inhibe edilmesi, halk ilacı olarak dut yaprağı çayının içilmesi şeklindeki geleneksel kullanımı destekler niteliktedir. Bu ekstraktların gösterdiği antidiyabetik etki, dut yaprağının içerdiği bu flavonoid sınıfı fenolik bileşiklerinden kaynaklı olabilir. Flavonoidler ayrıca metal şelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerinin katıldığı prosesleri azaltma özellikleri ile güçlü antioksidan aktivite gösteren bileşiklerdir.

Yapılan bir çalışmada altı farklı kültüre ait dut yaprakları Nisan ve Ekim ayları boyunca her ay toplanarak dört temel fenolik bileşenleri (klorojenik asit, benzoik asit, rutin, astragalın) ve antioksidan aktivite üzerine hasat zamanının etkisi araştırıldığında, sonuçlarda dikkate değer farklılıklar olduğu bildirilmiştir ([Zou vd., 2012](#)). Son yapılan yeni bir çalışmada ise [Xiao vd. \(2020\)](#) 50 dut çeşidinin yapraklarında DNJ, gama-amino bütirik asit (GABA), tannin, flavonoid ve polisakkarit içeriklerini araştırmış ve Çin'in 11 farklı ili, Japonya, Sri Lanka ve Özbekistan'dan toplanan bu dut çeşitlerinde analizlenen biyoaktif bileşenler arasında farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla çalışmalarda ağacın türü, yetiştiği yer, materyalin toplanma zamanı gibi parametrelerin bitkinin fitokimyasal içeriği üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Eski çağlardan beri yetişen ve farklı kültürlerde farklı uygulama alanları bulan dut yaprakları, önümüzdeki süreçte fonksiyonel bir gıda katkı maddesi olma potansiyeli ile ([İnce ve Çağındı, 2020](#)), özel çay veya içeceklere eklenmek sureti ile veya günlük diyetle sebze olarak dahil edilerek kullanım alanı bulabileceğinden dolayı bu çalışmada Edirne ilinde yetişen beyaz ve siyah dut yapraklarının antioksidan aktivite yönünden kapsamlı incelenmesi ve antidiyabetik aktivite açısından potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

#### 4. Sonuçlar

Çalışmamızda Edirne yöresinde yetişmiş olan beyaz ve siyah dut ağacı yapraklarının su ve etanol ekstraktlarının içerdiği fitobileşen miktarları belirlenmiş ve ham ekstrakta geçebilen biyoaktif bileşenlerin antioksidan aktiviteleri DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>•+</sup> giderme metodları,  $\beta$ -karoten ağartma metodu, CUPRAC metodu ve metal şelatlama metodunu içeren beş farklı antioksidan aktivite testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm ekstraktlarda konsantrasyon artışı ile radikal giderme oranlarında ve toplam antioksidan aktivitede artış olmakla birlikte, siyah dut yaprağının etanol ekstraktı diğerlerine göre daha iyi aktivite göstermiştir. Önemli ikincil metabolitlerden olan polifenolik bileşikler, bitkilerin gösterdikleri antioksidan aktivite ve enzim inhibisyonu gibi biyolojik aktivitelerden sorumludurlar. Çalışmamızda yaprak su ekstraktlarının *in vitro* koşullarda iki önemli karbonhidrat sindirim enziminin aktivitesini azaltması; kaynatılarak içilen dut yaprağı suyunun halk arasında hipoglisemik etki amaçlı kullanımını desteklemesine rağmen, daha genişletilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır. Beyaz ve siyah dut yaprağı su ekstraktları, karbonhidrat sindirimi ile ilgili enzimler üzerinde %50'nin altında inhibisyon etkisi göstermiştir. Ancak son zamanlarda bitki kaynaklı doğal ürünler ile enzim inhibisyonu, ilaç geliştirme çalışmalarında önem kazandığı için bu inhibisyon oranları dikkate değerdir. Bu sonuçlar, bitkinin enzim aktivitesini inhibe eden biyoaktif bileşikler içerdiği anlamını taşımakta olup,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonundan sorumlu bileşiklerin tanımlanmalarına yönelik daha fazla çalışmanın gerçekleştirilmesiyle dut ağacı yaprakları sağlık, gıda veya kozmetik alanlarında doğal bir kaynak olarak değerlendirilebilir.



## Yazar Katkıları

Şebnem Selen İşbilir: Çalışmayı planlamış ve tasarlamış, denetlemiş, verileri kontrol etmiş ve makaleyi yazmıştır.

Ecren Çelik: Deneysel çalışmalarını yürütmüş, verileri elde ederek deney sonuçlarını hazırlamıştır.

## Yazar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

- Andallu, B., Shankaran, M., Ullagaddi R. ve Iyer, S. (2014). *In vitro* free radical scavenging and *in vivo* anti-oxidant potential of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Journal of Herbal Medicine*, 4, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.10.002>
- Anwar, F., Kanwal, S., Shabir, G., Alkharfy, HM. ve Gilani, AH. (2015). Antioxidant and antimicrobial attributes of different solvent extracts from leaves of four species of mulberry. *International Journal of Pharmacology*, 11(7), 757-765. Erişim adresi: <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2015.757.765>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981. <http://dx.doi.org/10.1021/jf048741x>
- Apostolidis, E., Kwon, YI. ve Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herbal, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(1), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.06.001>
- Arituluk, ZC. ve Ezer, N. (2012). Halk arasında diyabete karşı kullanılan bitkiler (Türkiye)-II. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 179-208. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/hujpharm/issue/49831/639072>
- Asgar A. (2013). Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 16, 91-103. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.595864>
- Aslan, M., Orhan, N., Deliorman Orhan, D. ve Ergun, F. (2010). Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 384-389. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.040>
- Bae, SH. ve Suh, HF. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT- Food Science and Technology*, 40, 955-962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.06.007>
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Bondada, A., Venkata, AVK. ve Nallanchakravarthula, V. (2014). Influence of mulberry (*Morus indica* L.) leaves on antioxidants and antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats. *International Journal of Diabetes Developing Countries*, 34, 69-76. <https://doi.org/10.1007/s13410-013-0139-x>
- Brouillard, R. ve Dangles, O., (1993). Flavonoids and flower colour. In: Harborne JB. (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, (sf. 565-588). London: Chapman and Hall.
- Chon, S., Kim YM., Park, YJ., Heo, BG., Park, YS. ve Gorinstein, S. (2009). Antioxidant and antiproliferative effects of methanol extracts from raw and fermented parts of mulberry plant (*Morus alba* L.). *European Food Research and Technology*, 230, 231-237. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1165-2>
- Çubuk G. ve İnce S. (2015). Oral Antidiyabetik İlaçlar, *Kocatepe Veterineri Journal*, 8(1), 95-102. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/385263>
- Dasgupta, A ve Klein, K. (2014). Oxidative Stress Related to Other Diseases, In: A. Dasgupta ve K. Klein (Ed.), *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements: Prevention and Treatment*, (sf. 185-207).
- Dinis, TCP., Madeira, VMC. ve Almeida, LM. (1994). Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-169. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1485>
- Gougoulias, N. (2015). Evaluation of antioxidant activity and polyphenol content of leaves from some fruit species. *Oxidation Communications*, 38(1), 35-45. Erişim adresi: <https://scibulcom.net/en/article/QgkTj37Vp9nJIBTMwHH>

- Gündoğdu, M., Muradoğlu, F., Gazioğlu Sensoy, RI. ve Yılmaz, H. (2011). Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132, 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.035>
- Halliwell B. ve Gutteridge JM., (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)
- Hasim, WAL, Uci, S. ve Didah, NF. (2020). *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibition and antioxidant activity of mulberry (*Morus alba* L.) leaf ethanolic extract. *Jurnal Gizi dan Pangan*, 15(1), 45-52. <https://doi.org/10.25182/jgp.2020.15.1.45-52>
- He, X., Chen, X., Ou, X., Ma, L., Xu, X. ve Huang, K. (2020). Evaluation of flavonoid and polyphenol constituents in mulberry leaves using HPLC fingerprint analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 55, 526-533. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14281>
- Hu, X., Jiang, L., Zhang, J., Deng, W., Wang, H. ve Wei, Z. (2013). Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves from 132 varieties. *Industrial Crops and Products*, 49, 782-784. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.030>
- Iqbal, S., Younas, U., Sirajuddin, D., Chan, KV., Sarfraz, RA. ve Uddin, K. (2012). Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): A comparative study. *International Journal of Molecular Science*, 13, 6651-6664. <https://doi.org/10.3390/ijms13066651>
- İnce, C. ve Çağındı, Ö. (2020). Beyaz ve tam buğday unlu ekmek çeşitlerine eklenen beyaz dut (*Morus alba*) yaprak ve posasının antioksidan ve antidiyabetik aktivite üzerine etkisi. *Gıda*, 45(5), 977-988. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20039>
- Jozefczuka, J., Malikowska, K., Glapa, A., Nowak JK., Bajerska J., Lisowska A.ve Walkowiak J., (2017). Mulberry leaf extract decreases digestion and absorption of starch in healthy subjects-A randomized, placebo-controlled, crossover study. *Advances in Medical Sciences*, 62, 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.03.002>
- Katoch, R. (2011). Methods for nutritional quality evaluation of food materials. In: *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Springer, New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9785-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9785-2_13)
- Levickiene, D., Jariene, E., Gajewski, M., Danilcenko, H., Vaitkeviciene, N., Przybyl, FL. ve Sitarek, M. (2017). Influence of harvest time on biologically active compounds and the antioxidant activity in leaves of mulberry grown in Lithuania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(2), 431-436. <https://doi.org/10.15835/nbha45210779>
- Liaudanskas, M., Viškėlis, P., Raudonis, R., Kviklys, D., Uselis, N. ve Janulis, V. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. Article ID 306217. <https://doi.org/10.1155/2014/306217>
- Liu, C., Xiang, W., Yu, Y., Shi, Z., Huang, X. ve Xu, L. (2015). Comparative analysis of 1-deoxynojirimycin contribution degree to alfa-glucosidase inhibitory activity and physiological distribution in *Morus alba* L. *Industrial Crops and Products*, 70, 309-315. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.046>
- Madalageri, NK., Nagaraj, L. ve Nidamarthi SB. (2016). Evaluation and comparative study of hypoglycaemic activity of *Morus alba* with oral hypoglycaemic drug (Glibenclamide) in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 5(48), 3062+. Erişim adresi: <https://link.gale.com/apps/doc/A469639576/HRC?u=anon~98bb8a98&sid=googleScholar&xid=a55996b5>
- Miller, NJ. ve Luiz-Larrea, MB. (2002). Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 12, 39-51. <https://doi.org/10.1080/13590840220123352>
- Mohammadi, J. ve Naik, PR. (2012). The histopathologic effects of *Morus alba* leaf extract on the pancreas of diabetic rats. *Turkish Journal of Biology*, 36, 211-216. Erişim adresi: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/abstract.htm?id=12520>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Orak HH., Selen İsbilir S. ve Yagar H. (2012). Determination of antioxidant properties of lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1064-1074. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0138-6>

- Pietta, P., Minoggio, M. ve Bramati, L. (2003). Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. In: A. Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 28, Part I (sf. 257-312), Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80143-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80143-6)
- Pontes, FC., Abdalla, VCP., Imatomi, M., Fuentes, LFG. ve Gualtieri, SCJ. (2019). Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw.) DC. *Brazilian Journal of Biology*, 79(1), 127-132. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.179829>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Singleton, VL. ve Rossi, JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sonia, TA. ve Sharma, CP. (2014). Diabetes mellitus – An overview. In book: *Oral Delivery of Insulin* (pp 1-57).
- Souza, JGL., Pinto, FGS., Toledo, AG., Alves LFA. ve Alves, DS. (2020). Biological activities and phytochemical screening of leaf extracts from *Zanthoxylum caribaeum* L. (Rutaceae). *Bioscience Journal, Uberlandia*, 36(1), 223-234. <https://doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-48051>
- Thabti, I., Marzougui, N., Elfalleh, W. ve Ferchichi, A. (2011). Antioxidant composition and antioxidant activity of white (*Morus alba* L.), black (*Morus nigra* L.) and red (*Morus rubra* L.) mulberry leaves. *Acta Botanica Gallica*, 158(2), 205-214. Erişim adresi: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/12538078.2011.10516267>
- Tu, J., Shi, D., Wen, L., Jiang, Y., Zhao, Y., Yang, J., Liu, H., Liu, G. ve Yang, B. (2019). Identification of moracin N in mulberry leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110730. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110730>
- Tuzlacı, E. ve Bulut, GE. (2007). Turkish folk medicinal plants, Part VII: Ezine (Çanakkale). *Istanbul University Faculty of Pharmacy*, 39, 39-51. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/iujfp/issue/577/5699>
- Tuzlacı, E. ve Sadıkoğlu, E. (2007). Turkish folk medicinal plants, Part VI: Koçarlı (Aydın). *Istanbul University Faculty of Pharmacy*, 39, 25-37. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/iujfp/issue/577/5697>
- Tuzlacı E. ve Şenkardeş İ. (2011). Turkish folk medicinal plants, X: Ürgüp (Nevşehir). *Marmara Pharmaceutical Journal*, 15, 58-68. Erişim adresi: <https://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84878797998&partnerID=40&md5=a40ea012eeae93d3a943f5dc7aed22e0>
- Xiao, J., Ni, X., Kai, G. ve Chen, X. (2013). A review on structure–activity relationship of dietary polyphenols inhibiting  $\alpha$ -amylase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 497-506. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.548108>
- Xiao, H., Zhang, YQ., Ding, XW., Huang, X.Z., Li, R. ve Shen, YH. (2020). Evaluation of bioactive compound contents in 50 varieties of mulberry leaves originating from different regions. *International Food Research Journal*, 27(3), 516-528.
- Yatoo, MI., Saxena, A., Gopalakrishnan, A., Alagawany, M. ve Dhama, K. (2017). Promising antidiabetic drugs, medicinal plants and herbs: An update. *International Journal of Pharmacology*, 137, 32-745. Erişim adresi: <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2017.732.745>
- Yu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, J., Shi, X., Huang, J., Yang, J., Zhang, Y. ve Deng, Z. (2018). Nutritional and functional components of mulberry leaves from different varieties: Evaluation of their potential as food materials. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1495-1507. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1489833>
- Zhishen, J., Mengchun, T. ve Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zoral, FB. ve Turgay Ö., (2014). Çeşitli gıda atıklarının toplam fenolik madde içeriğinin, antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin araştırılması. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 17(2), 24-33. <https://doi.org/10.18016/ksujns.03907>
- Zou, Y., Liao, S., Shen, W., Liu, F., Tang, C., Chen, CO. ve Sun, Y. (2012). Phenolics and antioxidant activity of mulberry leaves depend on cultivar and harvest month in Southern China. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 16544-16553. <https://doi.org/10.3390/ijms131216544>



## Effect of Vitamin C on Cadmium Depending Growth and Vitamin C Contents of *Citrobacter Freundii*

Muhammad Salihu Ibrahim<sup>1</sup>, Meltem Çakmak<sup>2</sup>, Dursun Özer<sup>2</sup>, Fikret Karatas<sup>1\*</sup>, Sinan Saydam<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Fırat University, Elazığ, Turkey

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Fırat University, Elazığ, Turkey

### Article History

Received: 08.06.2021

Accepted: 31.08.2021

Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** – *Citrobacter freundii* bacteria were grown in LB medium containing cadmium ion. In order to reduce adverse effect caused by cadmium, different concentrations of vitamin C, were added to the growth medium. While the concentration of bacteria grown was determined by spectrophotometer, the amounts of water and fat-soluble vitamins were also determined by HPLC. The cadmium concentration varied from 0 (control), to 10, 20, 40, 60, 75, 100, 125 ppm in LB growth medium. The effect of cadmium has not been observed on the growth of bacteria, up to 40 ppm, on the other hand no significant microorganism growth was observed over 150 ppm cadmium. Significant change of bacteria concentration was observed in the medium containing 75, 100 and 125 ppm Cd. Microorganism concentrations decreased 18.8, 40.5 and 45.5 percent in the growth medium containing 75, 100 and 125 ppm Cadmium respectively. With the addition of 75 ppm vitamin C to the same growth medium, microorganism concentration was decreased about 2.0, 28.0 and 31.0 percent, respectively compared to the control. In addition, fat and water-soluble vitamins in bacteria grown in cadmium-containing medium was decreased in comparison to the control ( $p < 0.05$ ). With the addition of 25, 50 and 75 ppm vitamin C to cadmium-containing medium, fat and water soluble vitamin concentrations were increased. As a result, it can be said that the negative effects of cadmium on bacterial growth and vitamin content can be reversed by the addition of vitamin C in to the growth medium of bacteria.

**Keywords** – Cadmium, *Citrobacter freundii*, HPLC, vitamin C, vitamins

### 1. Introduction

Bacteria is a microscopic single-cell species that prosper in a number of medium, such as soil, water, inside gut. Bacteria may be grouped on the basis of cell structure, cell metabolism or cell component variations like structure of DNA, fatty acids, pigments and antigens. Bacteria often give us a hand of support in various occasions such as conversion of milk to yogurt or helping with our digestion. As only bacteria and some archaea have the genes and enzymes required for synthesizing vitamin B<sub>12</sub> also known as cobalamin and supplying it via the food chain almost all animal life depends on bacteria for survival (Fang et al. 2017). Bacteria have a remarkable ability to breakdown a number of organic compounds and have been used in the production and bioremediation of waste. Bacteria also used to remove oil spills to digest the hydrocarbons (Cohen, 2002). *C. freundii* is a member of the Enterobacteriaceae family which is gram-negative bacterium (O'Hara et al. 1997), that is a soil microorganism, may also be seen in other places such as food intestinal tracts and sanitation (Wang et al. 2000). Even though *C. freundii* is a bacterial pathogen, also plays a big part

<sup>1</sup> muhammadibrahim1247@gmail.com

<sup>2</sup> cakmak\_meltem@hotmail.com

<sup>3</sup> dozer@firat.edu.tr

<sup>4</sup> fkaratas@firat.edu.tr

<sup>5</sup> ssaydam@firat.edu.tr

\*Corresponding Author



in the environment's nitrogen cycle, which is responsible for environmental reduction of nitrate to nitrite (Puchenkova, 1996). Heavy metals are toxic to living things even at low concentrations (Banfalvi, 2011). Cadmium is a heavy metal that has a substantial environmental and functional effect (Paschal et al. 2000). In biological systems, cellular organs and components such as cell membranes, mitochondria, lysosomes, endoplasmic reticulum, nuclei, certain metabolic enzymes, detoxification and cell damage repair have been documented to be impaired by heavy metals. Metal ions interact with components in cells, including DNA and nuclear proteins, causing damage to DNA and then altering conformation (Beyersmann & Hartwig, 2008). Cadmium induces cytotoxic effects in an *in vitro* experiment at concentrations 0.1 to 10 mM and the free radical damage to DNA. Vitamins perform regulatory functions in the living system rather than being a part of compounds. In this respect, they are similar to hormones and play a catalyst role in metabolic events. Vitamins help the efficient use of nutrients in energy generation (Kennedy, 2016). Vitamin C is effective in the release of some hormones in case of stress and has a strong antioxidant effect (Devaki & Raveendran, 2017). Bacteria are the microorganisms with the highest number and mass on earth. Bacteria are used in the synthesis of many drugs used in the health industry because they use cheap renewable resources to multiply, their ability to reproduce at a high rate, and they can be modified due to their simple structure. In addition, it provides a great advantage in terms of medical research, as they have many common features with other living things. For the stated reasons, *C. freundii* (NRRL B-2643) was preferred in the study. The aim of this study is to investigate the effect of cadmium together with the counter effect of vitamin C on the growth and vitamin contents of *C. freundii*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Material

In this study, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) grown in LB medium (10.0 g peptone, 5.0 g Yeast extract and 10.0 g NaCl per liter) was used. *C. freundii* available in our laboratory was used. All chemicals used in the study are of analytical purity and were obtained from Sigma-Merck.

The following groups were studied;

1. Control: *C. freundii* was added to sterile LB medium.
2. Cadmium group: Different amounts of cadmium chloride were added to the control group.
3. Vitamin C group: Different amounts vitamin C solution was added to the cadmium group.

After inoculation, it was incubated at 37 °C with 150 rpm, for 18 hours in an orbital shaker (Selecta Rotabit, Spain). At the end of the incubation period, the concentration of bacteria was determined by reading the absorbance at 600 nm with spectrophotometer (CHEBIOS s.r.l. Italy)

Then growth medium centrifuged at 8000 rpm, 10 °C for 10 minutes, (Nüve NF 800 R Türkiye) the precipitated cells were washed twice with distilled water, and centrifuged again and used in further processing.

### 2.2. Determination of fat soluble vitamins

6.0 mL ethanol was added to the known amount of bacteria and vortexed. Then, the bacteria solution was sonicated (Wise Clean, WUC-AO3H, 170 W) in ice water bath, 10 times each for 30 seconds. After that it was centrifuged at 8000 rpm for 10 minutes, then 1.0 mL of n-hexane was added to each tube and centrifuged again for 6 minutes, the n-hexane phase was taken into the glass tube and this process was repeated twice. The hexane was removed under vacuum at 30 °C and 1.0 mL of methanol was added to solve vitamins and transferred to HPLC vials for analysis. Methanol-acetonitrile-water (33:63:4 v/v) was used as mobile phase (ODS-2 column, 25 cm, 4.6 mm ID, 5 µm) (Miller et al. 1984; Ibrahim et al. 2017).

### 2.3. Determination of water soluble vitamins

The known amount of microorganism taken and 3.0 mL of distilled water was added and vortexed. The mixture was sonicated 10 times in ice-water bath for 30 seconds each. Then, 1.0 mL of 0.5 M HClO<sub>4</sub> added and vortexed, the mixture were centrifuged at 8000 rpm for 10 minutes. The supernatant was taken into vials and analysed by HPLC. Analyses of water soluble vitamins determined according to (Amidžić et al. 2005 and Ibrahim et al. 2017) using Supelcosil LC-18-DB column (150 mm x 4.6 mm ID, 5 µm), methanol, 5 mM heptanesulfonic acid sodium salt in 0.1% trimethylamine (25:75 v/v), pH 2.8 as mobile phase.

### 2.4. Statistical Analysis

All measurements were triplicated and results were subjected to statistical analysis by SPSS 10.0 and significance was expressed as  $p < 0.05$ .

## 3. Results and Discussion

*C. freundii* was grown in the presence of 0 (Control), 10, 20, 40, 60, 75, 100 and 125 ppm cadmium in LB medium. It was observed that, *C. freundii* concentration was not effected significantly by the addition of cadmium up to 40 ppm when compared to the control ( $p > 0.05$ ). Addition of cadmium to the LB growth medium at 75, 100 and 125 ppm reduced the concentration of *C. freundii* to about 18.8, 40.5 and 45.5 percent respectively to the control. No significant microorganism growth was observed in cadmium concentrations higher than 150 ppm (Figure 1).

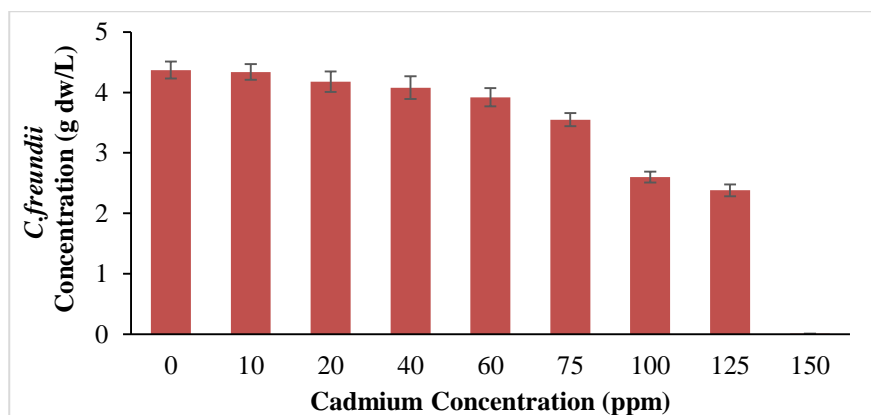


Figure 1. *C. freundii* concentrations at varying cadmium concentration

In the study conducted by Yiğit et al. (2013) it was reported that the growth rate of *Lactobacillus brevis* started to decrease more than 35 ppm cadmium. It has been demonstrated that 100 ppm cadmium concentration has a negative effect on the growth of *B. mucilaginosus* and *A. niger* microorganisms (Monballiu et al. 2015). The decrease in microorganism concentration may be due to the toxic effect of cadmium in the cell, which effects many metabolic activities including protein synthesis (Çınar, 2003).

To observe the counter effect of cadmium, various concentrations of vitamin C were added to the growth medium containing 75, 100 and 125 ppm cadmium. Vitamin C has a role in tissue repair, protein formation, inactivation of toxic metals and protection of other vitamins (such as A and E), DNA from the harmful effects of oxidation (Hamza, 2017). In a study conducted by Sahiti et al. (2020), it was reported that vitamin C reduced the heavy metal accumulation in the tissues. Due to these properties of vitamin C, various concentrations of vitamin C (25, 50 and 75 ppm) were added to the LB medium containing cadmium, in order to reduce the negative effect of cadmium. The concentration of microorganisms in the control (4.37 g dw/L) increased to 4.64, 4.77 and 4.82 g dw/L, with the addition of vitamin C, 25, 50 and 75 ppm respectively.

It can be seen from the results that, the negative effect of cadmium decreased due to the increase in the vitamin C concentration added to the growth LB medium (Figure 2). As can be seen in Figure 2, 75 ppm vitamin



C added to the growth medium containing 100 ppm cadmium, the bacteria concentration increased from 2.60 to 3.04 g dw/L.

It has been reported that vitamin C is one of the effective factors in reducing the toxicity of cadmium (Fox et al., 1980). Vitamins, which have different biochemical functions, are organic compounds that are needed in small amounts for the proper functioning of metabolism. They are divided into two groups, fat and water-soluble. Retinoids are essential compounds for vision, reproduction, growth and strength of epithelial tissue. Carotenoids are powerful antioxidants against radical attacks as they pre-vent radicals formed during lipid peroxidation (Gutteridge & Halliwell, 1988).

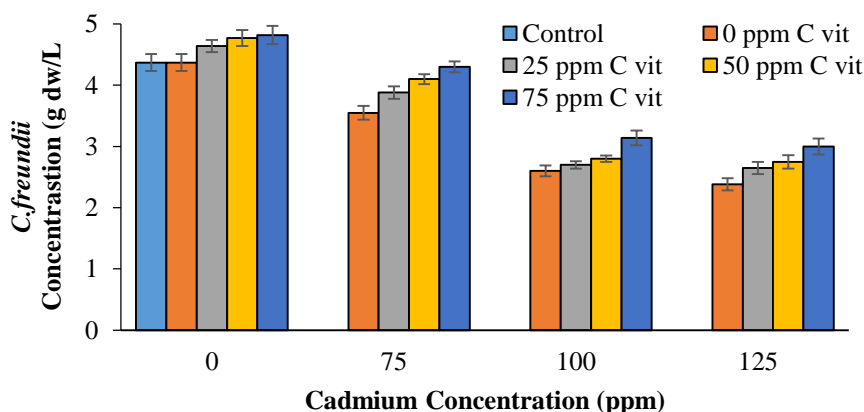


Figure 2. *C. freundii* concentrations at varying cadmium concentration with addition of vitamin C.

Vitamin E is an important in protecting unsaturated fatty acids in the cell membrane against the oxidation of free radicals. By saturating peroxides and hydroperoxides with hydrogen ions, it reduces the activity of peroxide radicals and inhibits the formation of auto-oxidation (Ognjanovic et al. 2003). The experimental results showed that a significant amount of vitamin A, E and  $\beta$ -carotene were decrease in the microorganism depending on the cadmium concentration added to the growth medium ( $p < 0.05$ ) (Figure 3,4,5). The loss of vitamin A, E and  $\beta$ -carotene in the *C. freundii* 75 ppm cadmium in the LB medium was found to be 48, 45 and 41 percent, respectively, on the other hand, addition of 125 ppm cadmium in to the LB growth medium, increased the vitamin loss to 71, 55 and 49 percent, respectively (Figure 3,4,5). Addition of vitamin C to the growth medium containing cadmium reduced the fat-soluble vitamin losses in the microorganism. The amount of reduction in vitamin losses was found to be depend on the added vitamin C concentration to the medium (Figure 3,4,5). When vitamin A, E and  $\beta$ -carotene concentration compared in the microorganism with and without addition of 75 ppm vitamin C to the LB medium containing 75 ppm cadmium, it was observed the increase of these compounds in the microorganism 0.30, 0.96 and 0.11  $\mu\text{g/g dw}$ , respectively.

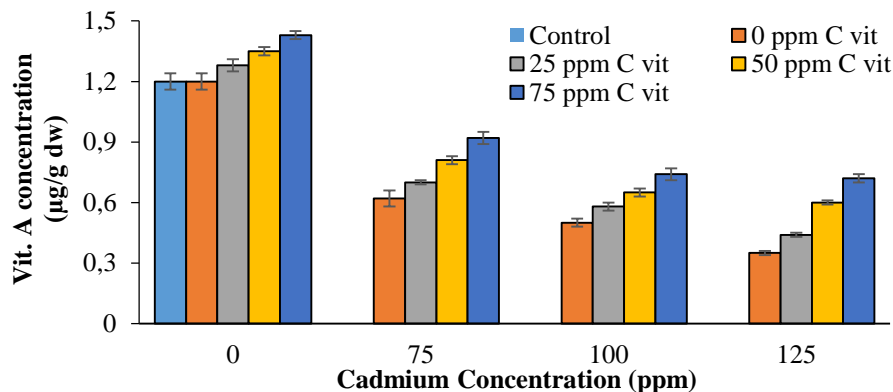


Figure 3. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin A in *C. freundii*.

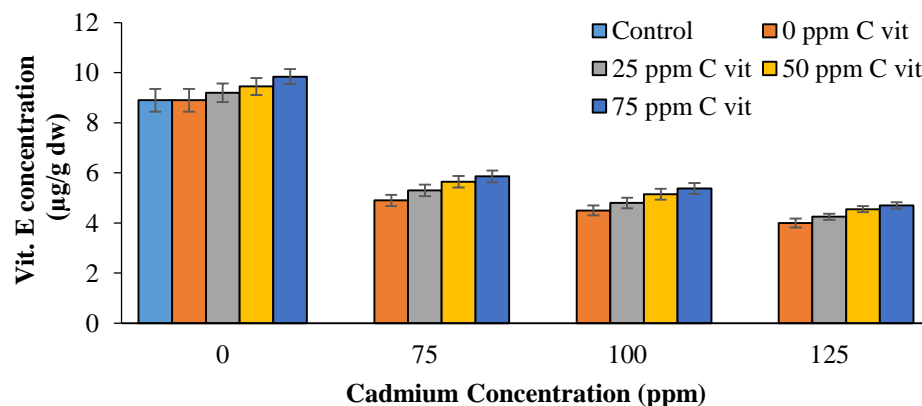


Figure 4. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin E in *C. freundii*.

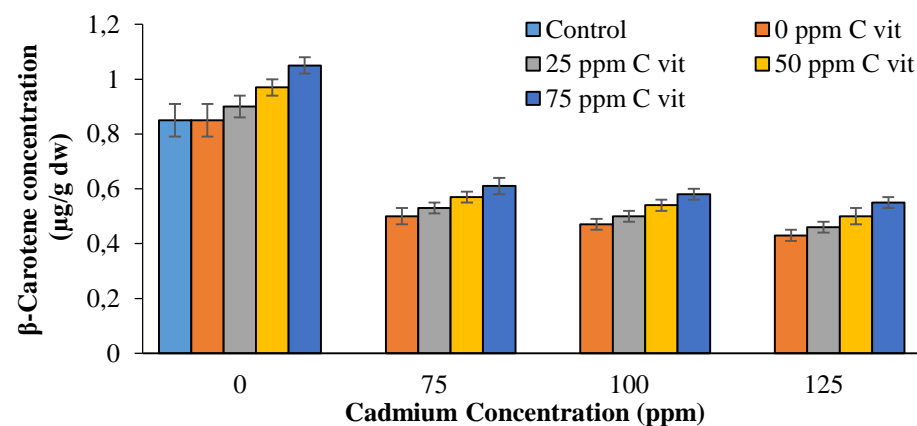


Figure 5. Effect of cadmium and vitamin C on the level of Beta-carotene in *C. freundii*.

Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> play a key role in the energy metabolism of the cell. Vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>6</sub> is an essential for a health of nervous system while vitamin B<sub>3</sub> regulates blood circulation. Vitamin B<sub>6</sub> and together with vitamin B<sub>9</sub>, they play a role in the formation of red blood cells. Vitamin B<sub>12</sub> is an important in nucleic acid metabolism and myelin synthesis in addition to methyl transfer (Schellack, 2015; Young et al. 2019).

A significant decrease in the amount of water-soluble vitamins in the microorganism was observed with the addition of cadmium to the growth medium. Increase of vitamin loss was proportional to the cadmium concentration in the nutrient medium ( $p < 0.05$ ) (Figure 6,7,8,9,10,11,12,13). Decrease in the level of C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> and B<sub>12</sub> vitamins in the microorganisms, containing 75 ppm cadmium in the growth medium, were 77, 66, 67, 50, 35, 34, 44 and 45 percent respectively. In addition, 125 ppm with cadmium in medium, further decreased the respective vitamin contents to 92, 83, 92, 66, 53, 47, 60 and 63 percent, respectively. Vitamin C added to the medium containing cadmium decreased the water-soluble vitamins loss in the microorganism. The amount of decreased in water-soluble vitamin losses has been shown to depend on the vitamin C concentration added to the medium (Figure 6,7,8,9,10,11,12,13). With the addition of 75 ppm vitamin C to the growth medium of bacteria containing 100 ppm cadmium, the amount of vitamins C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> and B<sub>12</sub> in the microorganism, has increased about 5.5, 2.3, 2.0, 45, 36, 30, 0.8 and 0.32 ppm, respectively.

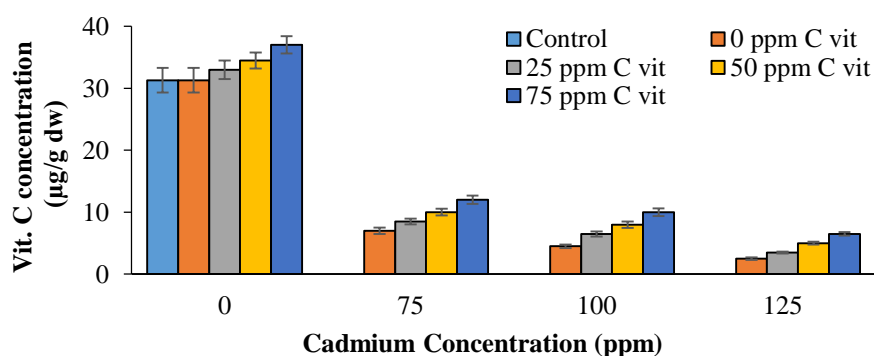


Figure 6. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin C in *C. freundii*

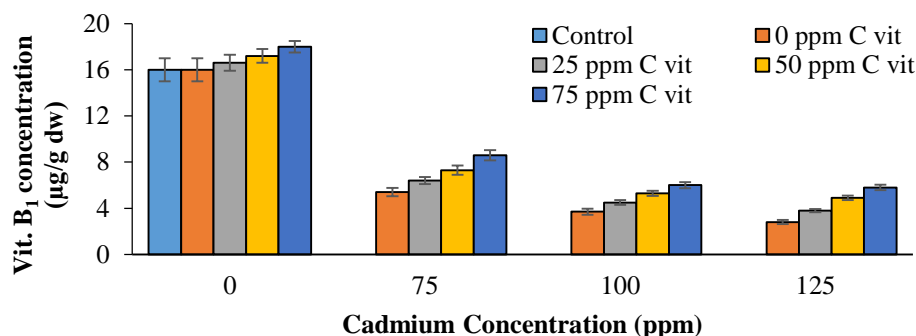


Figure 7. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin B<sub>1</sub> in *C. freundii*.

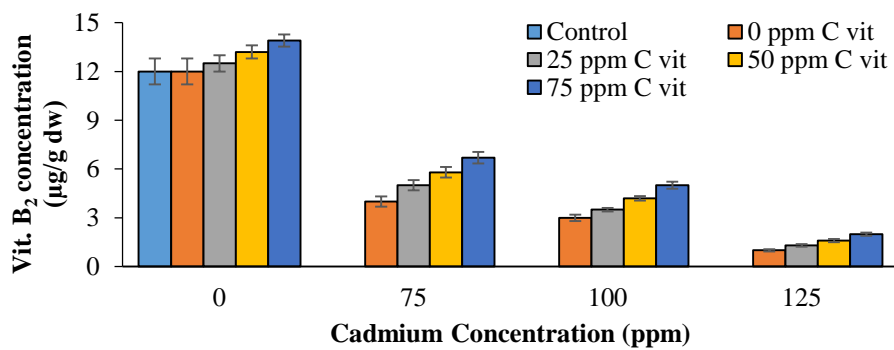


Figure 8. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin B<sub>2</sub> in *C. freundii*.

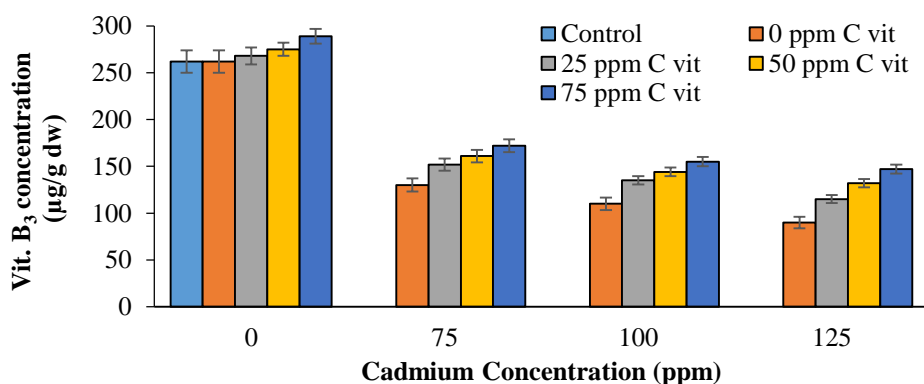


Figure 9. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin B<sub>3</sub> in *C. freundii*.

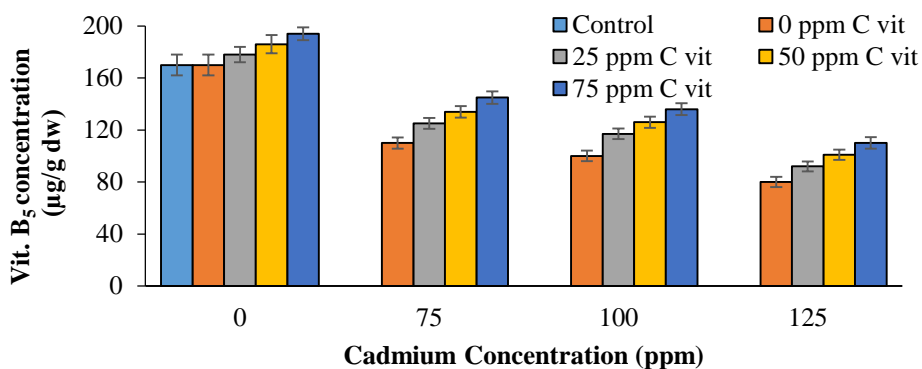


Figure 10. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin B<sub>5</sub> in *C. freundii*.

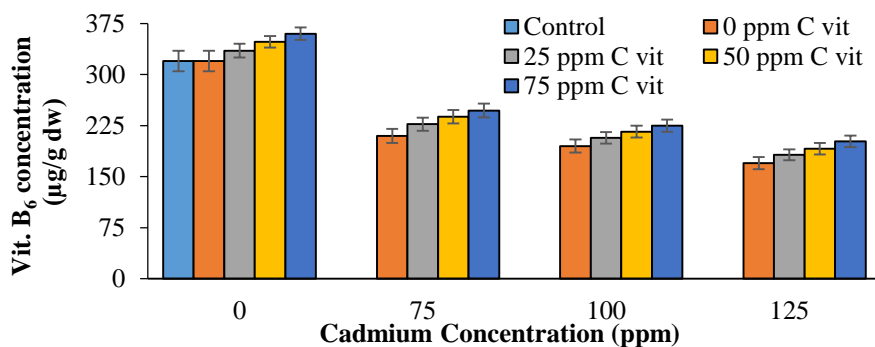


Figure 11. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin B<sub>6</sub> in *C. freundii*.

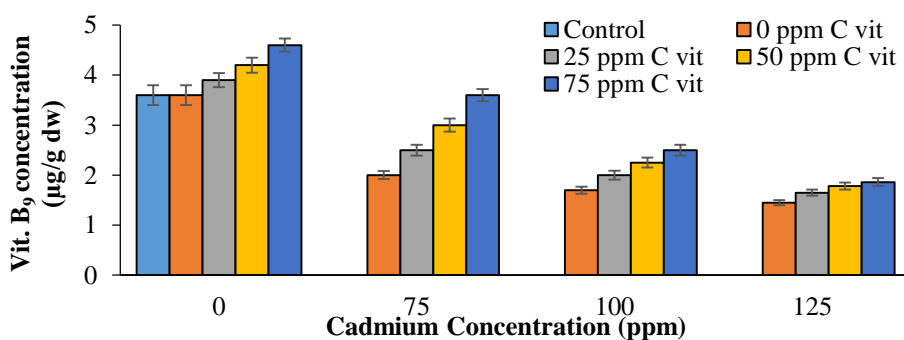


Figure 12. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin B<sub>9</sub> in *C. freundii*,

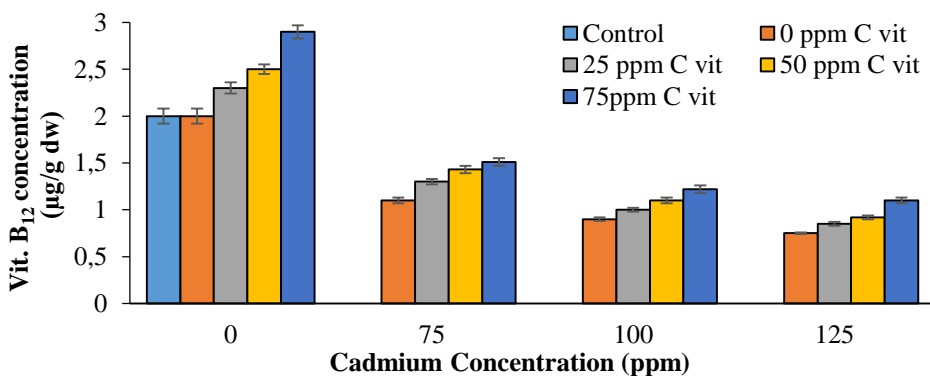


Figure 13. Effect of cadmium and vitamin C on the level of vitamin B<sub>12</sub> in *C. freundii*,

Leigh (1983) found the amounts of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>9</sub> in *B. subtilis* bacteria as 5.8, 36, 1530, 210, 2200, 0.11 and 1.10 µg / g dw, respectively. The reason for the decrease in the amount of vitamins with the addition of cadmium to the nutrient medium may be the result of the change in the membrane, DNA and thiol proteins of the microorganism, its interaction with antioxidant enzymes, inhibition in energy metabolism and oxidative stress (Casalino et al. 2002).

As a result, it can be said that vitamin C added to the nutrient medium containing cadmium increases both the concentration of microorganisms and the amount of fat and water-soluble vitamins by reducing the toxic and negative effects of cadmium on metabolism.

#### 4. Conclusions

It has been observed that, depending on the concentration of cadmium added to the LB medium for the production of the microorganism, the growth of the bacteria as well as the decrease in the content of fat and water soluble vitamins. The addition of vitamin C, known for its antioxidant properties, to the nutrient medium containing cadmium reduced the negative effect of cadmium depending on the vitamin concentration.

#### Acknowledgement

Firat University was financially supported by the Scientific Research Projects Unit (FÜBAP) with the project number FF 18.15.

#### Author Contributions

Muhammad Salihu Ibrahim: Performing the experiments.

Meltem Çakmak: Performing the experiments.

Dursun Özer: Designing the experiments, evaluating the results and writing.

Fikret Karatas: Designing the experiments, evaluating the results and writing.

Sinan Saydam: Designing and writing the manuscript.

#### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Amidžić, R., Brborić, J., Čudina, O., & Vladimirov, S. (2005). Rp-HPLC determination of vitamins, folic acid and B12 in multivitamin tablets. *Journal of the Serbian Chemical Society, C 70*, 1229-1235. DOI: <http://doi.org/10.2298/JSC0510229A>
- Banfalvi, G. (2011). Cellular Effects of Heavy Metals. Netherlands, London, New York: Springer. ISBN 978-94-007-0428-2
- Beyersmann, D., & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of toxicology, C 82*, 493-51. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0313-y.2h>
- Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., & Landriscina, C. (2002). Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology, 179*: 37-50. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00245-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00245-7).
- Cohen, Y. (2002). Bioremediation of oil by marine microbial mats. *International Microbiology, C 5*, 189-193. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0089-5>.
- Çınar, M. (2003). Kadmiyumun biyolojik sistemdeki etkileri. *Veterinarium, 14(1)*, 79-84, <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/906611>
- Devaki, S. J., & Raveendran, R. L. (2017). Vitamin C: Sources, Functions, Sensing and Analysis. INTECH <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70162>
- Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B 12: a review and future perspectives. *Microbial Cell Factories, C 16*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0631-y>.
- Fox, M. R. S., Richard, M. J., Jacobs, R. M., Jones, A. O. L., & Fry, B. E. (1980). Effects of vitamin C and iron on cadmium metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences, 355*, 249-26. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb21343.x>
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1988). The Deoxsiriboz Assay Both for Free Radical and for Site Specific Hydroxyl Radical Production. *Biochemistry, 253(3)*, 932-933.



<https://doi.org/10.1042/bj2530932>

- Hamza, Amal H. (2017). Vitamin C: Sources, Functions, Sensing and Analysis. 10.5772/66058 (Chapter 1), <https://doi.org/10.5772/intechopen.7016>
- Ibrahim, M., Ibrahim, Y., Mukhtar, Z., & Karatas, F. (2017). Amount of vitamin A, vitamin E, vitamin C, malondialdehyde, glutathione, ghrelin, beta-carotene, lycopene in fruits of Hawthorn, Midland (Crataegus laevigata). *Journal of Human Nutrition & Food Science*, 5, 1112-1117. ISSN: 2333-6706
- Kennedy, D. O. (2016). B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review. *Nutrients* 8(68), 1-29. <https://doi.org/10.3390/nu8020068>
- Leigh, J. A. (1983). Levels of Water-Soluble Vitamins in Methanogenic and Non-Methanogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (3), 800-803. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.800-803.1983>
- Miller, K. W., Lorr, N. A., & Yang, C. S. (1984). Simultaneous determination of plasma retinol,  $\alpha$ -tocopherol, lycopene,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -carotene by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, C 138, 340-345. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90819-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90819-4)
- Monballiu, A., Cardon, N., Tri Nguyen, M., Cornelly, C., Meesschaert, B., & Chiang, Y.W. (2015). Tolerance of Chemoorganotrophic Bioleaching Microorganisms to Heavy Metal and Alkaline Stresses. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, (2015), 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/861874>.
- Ognjanovic, B. J., Pavlovic, S. Z., Maletic, D., Zikic, R. V., Stajn, A. S., Radojicic, R. M., Saicic, Z. S., & Petrovic, V. M. (2003). Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiological Research*, 52, 563- 570. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14535831>
- O'Hara, C. M., Westbrook, G. L., & Miller, J. M. (1997). Evaluation of Vitek GNI+ and Becton Dickinson Microbiology Systems Crystal E/NF identification systems for identification of members of the family Enterobacteriaceae and other gram-negative, glucose-fermenting and non-glucose-fermenting bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, C 35, 3269-3273. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.12.3269-3273.1997>.
- Paschal, D., Burt, V., Caudill, S., Gunter, E. W., Pirkle, J. L., Sampson, E. J., Miller, D. T., & Jackson, R. J. (2000). Exposure of the US population aged 6 years and older to cadmium: 1988–1994. *Archives of environmental contamination and toxicology*, C 38, 377-383. <https://doi.org/10.1007/s002449910050>
- Puchenkova, S. (1996). Enterobacteria in areas of water along the Crimean Coast. *Mikrobiologichnyi Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)*, C 58, 3-7. <https://europepmc.org/article/med/8983520>
- Sahiti, H., Bislimi, K., Rexhepi, A., & Dalo, E. (2020). Metal Accumulation and Effect of Vitamin C and E in Accumulated Heavy Metals in Different Tissues in Common Carp (Cyprinus carpio) Treated with Heavy Metals. *Polish Journal of Environmental Studies* 29(1), 799-805. <https://doi.org/10.15244/pjoes/103354>
- Schellack, G. (2015) B-complex vitamin deficiency and supplementation. *South African Pharmaceutical Journal*, 82(4), 28–32. <http://www.sapj.co.za/index.php/SAPJ/article/view/2003>
- Wang, J., Chang, S., Chen, Y., & Luh, K. (2000). Comparison of antimicrobial susceptibility of Citrobacter freundii isolates in two different time periods. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 33, 258-262. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11269372>
- Yiğit, A., Aktaş, N., & Şahan, T. (2013). Lactobacillus Brevis Mikroorganizmasının Çoğalma Kinetiğinin Cevap Yüzeyi Yöntemi ile İncelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/ Journal of The Institute of Natural & Applied Sciences* 18 (1-2):25-32, <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/204634>
- Young, L. M., Pipingas, A., White, D. J., Gauci, S., & Scholey, A. (2019). A Systematic Review and Meta-Analysis of B Vitamin Supplementation on Depressive Symptoms, Anxiety, and Stress: Effects on Healthy and 'At-Risk' Individuals. *Nutrients*, 11(9), 2232. <https://doi.org/10.3390/nu11092232>



## Assessment of Quality and Aroma Characteristics of Kefir Produced by Using Grain and Lyophilized Culture

İrem Şen Dağ<sup>1</sup>, Buket Aydeniz Güneşer<sup>2</sup>, Yonca Karagül Yüceer<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Food Engineering Department, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale

<sup>2</sup> Food Engineering Department, Faculty of Engineering, Usak University, Usak

### Article History

Received: 31.03.2021

Accepted: 08.07.2021

Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** – Kefir is traditionally produced using kefir grains, while lyophilized culture is widely used in industry. Microbial fermentation of kefir has critical importance on its aromatic profile and sensory attributes as well as its physicochemical parameters. The main objective of this study was to compare the differences between some physical, chemical, microbiological, sensory attributes and volatile components in kefir fermented with kefir grains and lyophilized cultures during storage. The compositional characteristic of kefir cultured by both kefir grains and lyophilized starter were monitored during 21-day storage in this study. In contrast to dramatic decreases in titratable acidity, serum separation and *Streptococcus* spp. count, an increase in the amount of various aroma compounds including 2-heptanone, butyric acid, hexanoic acid and octanoic acid was observed during storage of kefir samples. Incubation with lyophilized starter culture promoted kefir sensory and rheological attributes besides of improving its diacetyl and acetic acid aroma intensities compared with that incubation with kefir grain. “Sour”, “sweet”, “salty” and “bite (CO<sub>2</sub>)” were developed as taste terms, while “cooked” “creamy”, “fermented”, “dairy” and “yeast” were some aromatic terms for kefir samples developed by sensory evaluation. Consumer acceptance scores of the kefirs produced by using lyophilized cultures were higher than samples with grain.

**Keywords** – Aroma-active compound, kefir, kefir grain, lyophilized starter culture, sensory analysis

## 1. Introduction

Consuming fermented dairy products including yoghurt, cheese, sour cream, koumiss, and kefir have recently attracted attention due to their bioactive, functional and nutraceutical ingredients. Several researchers reported that nutrition benefits and health claims on the fermented dairy products such as regulating effect on the immune and nervous systems (Davras, Guzel-Seydim & Tas, 2018; Lv & Wang, 2009), treatment effect of inflammatory bowel disease (Sevencan et al., 2019), broad-spectrum antimicrobial, antimutagenic (Ahmed et al., 2013; Kussendrager & Van Hooijdonk, 2007; Leite et al., 2013), antioxidant effects (Erdoğan et al., 2019; Mulder et al., 2008), hypertension and high cholesterol levels lowering effects (Ahmed et al., 2013; Nielsen et al., 2014).

Although kefir has consumed in different countries from Eastern Europe to Central Asia owing to their healing effects since ancient times, it has still increasingly gained popularity today. Kefir is defined as drinkable dairy product obtained by fermentation with starter cultures or kefir grains, which contain various lactic acid and acetic acid bacteria spp., and yeasts (Codex Stan, 2003; Magalhães et al., 2011). It was reported that kefir should have at least 2.7% protein, less than 10% fat, and at least 0.6% titratable acidity and 10<sup>7</sup> and 10<sup>4</sup> cfu/g LAB and yeast, respectively (Codex Stan, 2003).

Traditionally, kefir is produced from 0.3-2 mm cauliflower-shaped, white to yellow-white in color, small or large irregular kefir grains include polysaccharide matrix and coagulated milk proteins. Moreover, kefir grain contains a balanced proportion of bacteria (*L. kefir*, *L. kefirgranum*) and yeasts (*S. kefir* and *C. kefir*). These

<sup>1</sup> iremsen0610@gmail.com

<sup>2</sup> buket.guneser@usak.edu.tr

<sup>3</sup> yoncayuceer@comu.edu.tr

\* Corresponding Author

microorganisms are carried out to milk from grain during kefir fermentation. Afterwards, kefir grains were filtered and preserved for reusing for next batches ([Chandan, 2013](#); [Guzel-Seydim et al., 2021](#)). The most significant distinction among kefir and the other dairy products is that kefir has self-carbonated, foamable structure and refreshing flavor because of CO<sub>2</sub> produced by yeast during alcohol fermentation.

Formation of flavor compounds in dairy products is known as a complex process, which comprises chemical and biochemical transformation of milk constituent ([Kranenburg et al., 2002](#)). Metabolic activity of starter cultures is main source of these complex processes. In this context, several flavor compounds are formed by metabolism of lactic acid bacteria, which are dominant flora in dairy products. Among flavor compounds in dairy products, carbonyl compounds such as acetaldehyde (yoghurt), acetoin (creamy), butanone (fruity), diacetyl (butter) are defined as main compounds, and other ones are responsible for enhancement of flavor or has important role as a precursor for the formation of main flavor components ([Cheng, 2010](#)). Moreover, lactic acid and alcohol fermentations induce sour/acidic taste and yeast aroma in kefir ([Chandan, 2013](#)).

Kefir is a good source of B-group vitamins, nutritionally important minerals (calcium, potassium, sodium etc.), and bioactive peptides described as angiotensin converting enzyme inhibitor, antithrombotic activities and nerve-calming effects ([Lv & Wang, 2009](#)), essential amino acids and conjugated linoleic acid (CLA) ([Ebner et al., 2015](#); [Sherkat, Shamsi, & Arjmand, 2016](#)). In addition, continuous consumption of kefir might also reduce higher glucose and LDL levels and induce to protection against to *Helicobacter pylori* ([Ahmed et al., 2013](#)).

Lyophilized culture is widely used culture in industry. Kefir grain is commonly used in home or small-scale production. It was known that using lyophilized culture or kefir grain can lead differences in the physico-chemical, microbiological, and various sensory characteristics in the product. Comparing differences between kefir samples fermented with kefir grains and lyophilized cultures in terms of some physical, chemical, microbiological, sensory attributes and volatile components during storage were aimed in the present study.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Two different kefir grains (G1 and G2) and lyophilized starter cultures (L1 and L2) were used in the present study. Grains were kindly provided by Danem Ltd. (G1) (Suleyman Demirel University Techno Park) and Ankara University (G2) (Department of Dairy Technology). Lyophilized kefir cultures were provided from Danem Ltd. (L1- Sevdamem) and Chr. Hansen Bio-Kefir culture (L2-eXact<sup>®</sup> KEFIR 2) (Chr. Hansen's Laboratory, Denmark).

### 2.2. Kefir Production

Ultra-high temperature (UHT) milk (SEK Dairy Company, Bursa, Turkey) was used to produce kefir samples. Kefir grains were activated into small amount of milk at 25°C for 18-24 h in the incubator (Nüve ES-120, Turkey). Activated kefir grains were inoculated (3 g grain/L milk) into UHT milk and milk samples were placed in an incubator for 18-24 h at 25 °C. Kefir fermentation was ended about at pH 4.8 and all kefir grains were filtered through a sieve. Prepared kefir samples (G1, G2) were filtered into sterile jars under aseptic conditions. Remaining kefir grains were retained in previously boiled and cooled tap water in the fridge at 4°C to be used in the other production process. To obtain kefir produced by lyophilized culture, activation process was not needed since the lyophilized culture was self-activated. The same fermentation process was used to obtain kefir samples (L1, L2) using lyophilized culture (0.5 g culture/L milk). All samples coded as G1, G2, L1, L2 were stored at refrigerator for 21 days.

### 2.3. Physicochemical and Microbial Analyses

Total dry matter (%), protein (%) and titratable acidity (lactic acid%) were measured in accordance with [Bradley et al. \(1992\)](#). pH and viscosity analyses were performed by using a pH meter (Sartorius BP-11,

Germany) and a rotational viscometer (Brookfield viscosimeter DV II+Pro, Brookfield Engineering, USA), respectively. Total fat and ash contents were determined using NEN method 3059 (NEN, 1969) and AOAC method 945.46 (AOAC, 2000), respectively. Compositional analyses of the samples were carried out on the first day of storage. Serum separation of the samples were measured in accordance with Atamer & Sezgin (1986). All chemicals, solvents and internal standards were purchased from Merck Co. (Darmstadt, Germany) and Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA). Number of *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. and yeast in the samples were determined according to Dave & Shah (1996), IDF (1997) and Ünlütürk & Turantaş (1996), respectively.

## 2.4. Determination of Volatile Compounds

Aroma active compounds were determined by Solid phase microextraction-Gas chromatography-olfactometry (SPME-GCO). To identify and quantify volatiles gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used. The procedures mentioned in Sen and Karagül Yüceer (2019) were used for both GCO and GCMS analysis.

## 2.5. Sensory Evaluation of Kefir Samples

While, Spectrum<sup>TM</sup> analysis used to identify the special taste and aroma attributes of the kefir samples, the consumer acceptance test was done by using hedonic scale (9-point) to determine liking of the samples (Meilgaard, Civille & Carr, 1999). Five female and one male panelists (ages 24-45 years) used Spectrum<sup>TM</sup> method to evaluate the samples. All panelists received approximately 100 hours of training to generate and define sensory descriptors. 15-point scale was used to determine the intensity of the attributes.

Consumer acceptance test of kefir samples (25-30 mL) were performed by using 9-point hedonic scale for appearance, consistency, and taste/flavor properties at room temperature (25°C). All panelists were also asked to rank the kefir samples they liked (from most preferred with number 1 to least preferred with number 4) at the end of sensory evaluation. Consumer panel consisted of 101 subjects (mainly academician and student) evaluated the kefir samples (Meilgaard et al., 1999). All samples were served to panelists in disposable clear cups and water was provided to clean the palate.

## 2.6. Statistical Analysis

To determine the differences among the samples in terms of chemical parameters, One way-ANOVA was used. Two way-ANOVA was applied to show the effects of storage and types of culture on samples with respect to physicochemical, microbiological, and sensory characteristics. The findings of consumer analysis were evaluated by Kruskal-Wallis test (Sheskin, 2000). SPSS (1994) and Minitab (2010) were used for all statistical analysis. All analyses were duplicated.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Physicochemical Characteristics of Kefir Samples

Basic composition of UHT milks used to produce kefir samples were followed as 11.35-11.41% dry matter, 0.68% ash, 6.68-6.75 pH, 0.18% titratable acidity, 3.26-3.47% protein and 3-3.08% fat contents. In this study, the basic contents of kefir samples fermented with kefir grain and lyophilized cultures were determined on the 1st day of storage (Table 1). Amount of protein in the samples were ranged from 3.64 to 4.22%. No significant differences among the samples in terms of protein content were detected ( $P>0.05$ ).

Table 1  
Basic composition of kefir samples on the first day of storage

Content (%)	Kefir samples (Mean $\pm$ SE)			
	G1	G2	L1	L2
Protein	3.64 $\pm$ 0.17	3.71 $\pm$ 0.01	3.69 $\pm$ 0.12	4.22 $\pm$ 0.20
Fat	2.76 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	2.88 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.69 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	2.68 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Dry matter	10.62 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	10.54 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	10.93 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	10.68 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
Ash	0.69 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.68 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.71 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Means followed by different letters in the same row represent significant differences ( $P \leq 0.05$ ). SE: Standard error. G1 and G2: kefir samples produced by kefir grains, L1 and L2: kefir samples produced by lyophilized starter cultures

[Kök-Taş et al. \(2013\)](#) described that protein contents of kefir samples fermented with kefir grain and lyophilized cultures were 3.47% and 3.45%, respectively. Similar findings were also reported by [Karagözlü \(1990\)](#). Moreover, there were no significant differences in fat and dry matter contents of both kefir groups (G1-G2 and L1-L2). The fat contents of kefir samples were ranged between 2.68-2.88% whereas dry matter ranged between 10.54-10.93% in kefir samples. The findings of the present study supported by the findings of previous studies on kefir ([Güzel-Seydim et al. 2005](#); [Karagözlü 1990](#); [Kök-Taş et al. 2013](#))

pH, titratable acidity (%), serum separation (mL) and viscosity (cP) measurements of kefir samples fermented with kefir grain and lyophilized cultures were carried out during the storage (Table 2). The effect of storage on pH values in kefir samples was not significant ( $P \geq 0.05$ ) while kefir type affected pH values ( $P \leq 0.05$ ). Sample G2 had the highest pH value (4.73), while the lowest pH (4.35) was determined in sample L2 (Table 2).



Table 2

The changes of physicochemical properties in kefir samples during storage

Storage (days)	Kefir samples (Mean ±SE)				
	G1	G2	L1	L2	Mean
	pH				
1	4.39 ± 0.02	4.70 ± 0.01	4.39 ± 0.01	4.33 ± 0.01	4.45 ± 0.17
7	4.43 ± 0.01	4.77 ± 0.01	4.43 ± 0.02	4.35 ± 0.01	4.50 ± 0.19
21	4.45 ± 0.02	4.72 ± 0.03	4.45 ± 0.03	4.36 ± 0.01	4.50 ± 0.17
Mean	4.42 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.73 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.35 ± 0.02 <sup>c</sup>	
	Titratable acidity (lactic acid %)				
	G1	G2	L1	L2	Mean
1	0.82 ± 0.01	0.69 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.80 ± 0.07 <sup>A</sup>
7	0.76 ± 0.01	0.65 ± 0.02	0.76 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.74 ± 0.06 <sup>B</sup>
21	0.71 ± 0.05	0.68 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.81 ± 0.01	0.71 ± 0.06 <sup>B</sup>
Mean	0.76 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.04 <sup>a</sup>	
	Serum separation (mL)				
	G1	G2	L1	L2	Mean
1	8.25 ± 0.25	8.75 ± 0.25	8.75 ± 0.25	9.25 ± 0.25	8.75 ± 0.41
7	7.60 ± 0.25	7.75 ± 0.25	8.50 ± 0.50	8.25 ± 0.25	8.03 ± 0.42
21	7.75 ± 1.25	8.25 ± 0.75	8.13 ± 0.13	8.38 ± 0.13	8.13 ± 0.27
Mean	7.87 ± 0.34	8.25 ± 0.50	8.46 ± 0.31	8.63 ± 0.54	
	Viscosity (cP)				
	G1	G2	L1	L2	Mean
1	140.05 ± 1.70	75.80 ± 10.20	147.90 ± 1.00	148.18 ± 1.42	127.98 ± 34.99
7	140.85 ± 1.88	74.60 ± 13.30	148.82 ± 0.03	149.45 ± 0.20	128.43 ± 36.10
21	137.98 ± 9.68	77.90 ± 15.50	140.45 ± 1.05	141.97 ± 0.78	124.58 ± 31.16
Mean	139.63 ± 1.48 <sup>a</sup>	76.10 ± 1.67 <sup>b</sup>	146.53 ± 4.59 <sup>a</sup>	146.53 ± 4.00 <sup>a</sup>	

<sup>a, b, c</sup> Means followed by different letters represent significant differences among kefir samples

<sup>A, B</sup> Means followed by different letters represent significant differences among days of storage ( $P \leq 0.05$ ). SE: Standard error. G1 and G2: kefir samples produced by kefir grains, L1 and L2: kefir samples produced by lyophilized starter cultures

[Kök-Taş et al. \(2013\)](#) evaluated pH values in the stored kefir samples fermented with kefir grains and lyophilized cultures for 21 days. The researchers reported that pH values of kefir samples fermented with lyophilized cultures at 1, 7 and 21 days of storage were 4.49, 4.39 and 4.35, respectively while kefir samples fermented with kefir grain had pH 4.47, 4.38 and 4.29 in 1, 7 and 21 days of storage, respectively. Differences in pH values of the kefir samples can be ascribed to the diversity of kefir microbial flora.

Titratable acidities (%) of the samples were expressed as lactic acid. Effects of storage and kefir varieties on the titratable acidities were statistically significant, but the interactions in storage time and kefir varieties were not found to be significant. All titratable acidities decreased during the storage period. L2 group kefir samples had the highest titratable acidity (0.82%), but kefir samples in group G2 had the lowest titratable acidity (0.67%). No distinct differences were found in titratable acidities among other kefir samples. It was thought that using different cultures in kefir production and variation in lactic acid contents of each sample had led to difference between kefir samples. [Kök-Taş et al. \(2013\)](#) found lactic acid contents in the kefir samples fermented with kefir grains and lyophilized cultures between 0.84-0.92% and 0.81-0.92% respectively during 21-day storage.

Amount of serum separation (mL) in all samples were ranged between 7.87 to 8.63 mL during storage period (Table 2). Effects of storage and types of culture and interactions in storage time and kefir varieties on serum separation were not found to be significant. [Ersoy & Uysal \(2003\)](#) studied serum separation in kefir samples produced by kefir grain and lyophilized cultures. The results obtained for serum separation were determined 6 mL, 12 mL and 12 mL at 1, 6 and 9 days of storage, respectively. The results of serum separations in G1 and G2 samples were higher than those reported in the literature, pH values of G2 group were lower than those reported values to first day of storage.

There was a significant difference between kefir types in terms of viscosities ( $P \leq 0.05$ ), while kefir type by storage interactions and storage ( $P > 0.05$ ) were not significant in terms of viscosity values. The highest



viscosity was determined in L1 and L2 samples (146.53 cP), and the lowest mean was in G2 sample (76.10 cP). There were no significant differences among G1, L1 and L2 samples in terms of viscosity measurements. In a study conducted by [Kök-Taş et al. \(2013\)](#), viscosities of samples with kefir grain were measured 225, 202 and 247 mPa.s, when the viscosities of kefir samples fermented by lyophilized cultures were recorded as 312.7, 294.3 and 292.5 mPa.s after 1, 7 and 21 day, respectively.

### 3.2. Microbiological Characteristics of Kefir Samples

Changes in the counts of *Streptococcus* spp., and *Lactobacillus* spp. were presented in Table 3. Interaction of storage and samples on the counts of *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp was significant. Statistically significant reduction was determined in the count of *Streptococcus* spp. in sample L2 unlike other kefir samples during 21 day of storage ( $P \leq 0.05$ ). The mean counts of *Streptococcus* spp. in G1, G2 and L1 samples were 8.70, 8.52 and 8.62 log cfu/mL, respectively. For *Lactobacillus* spp., G1 sample had the lower counts than other kefir samples in the 1<sup>st</sup> day of storage while no significant differences were observed between kefir samples on the 21<sup>th</sup> day ( $P \geq 0.05$ ).

Similar results were also observed in previous studies. [Kök-Taş et al. \(2013\)](#) showed that *Lactobacillus* spp. count was ranged 8.03-9.21 log cfu/mL in kefir produced by grains while kefir samples produced from lyophilized culture had approximately 9.12 log cfu/mL of *Lactobacillus* spp. during the 21-day storage. Yeast count in kefir samples ranged between 1.33-5.56 log cfu/L and yeast count of kefir samples had been changed depending on the type of kefir culture ( $P \leq 0.05$ ). Generally, kefir samples produced by lyophilized culture had the lower yeast count than kefir samples produced by kefir grains. For example, the highest yeast count was observed in G2 sample (5.56 log cfu/L), whereas L2 sample (1.33 log cfu/L) had the lowest yeast count during the storage. The result was supported by the findings of [Güzel-Seydim et al. \(2005\)](#). The researchers found that the count of yeast in kefir samples produced by kefir grain and lyophilized culture ranged between 5.50-5.32 log cfu/mL and 4.77-5.0 log cfu/mL, respectively. Moreover, the yeast count in kefir samples produced by starter kefir culture increased during storage and this increase in yeast count was not determined by the researchers for kefir samples produced by using kefir grains.

In contrast to our findings, [Yıldız \(2009\)](#) determined higher *Lactobacillus* spp. and yeast counts as av. 7.41 log cfu/mL and 8.06 log cfu/mL, respectively in kefir samples with 3% fat content during 23-day storage at 4 °C.

Table 3

Counts of *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. in kefir samples during storage (log cfu/mL)

Storage (days)	Kefir samples (Mean ±SE)				
	<i>Streptococcus</i> spp.				
	G1	G2	L1	L2	Mean
1	8.99 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	8.84 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	8.62 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	6.81 ± 0.07 <sup>Ba</sup>	8.32 ± 0.15
21	8.40 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	8.19 ± 0.49 <sup>Aa</sup>	8.61 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	1.62 ± 0.31 <sup>Bb</sup>	6.71 ± 3.39
Mean	8.70 ± 0.42	8.52 ± 0.46	8.62 ± 0.01	4.22 ± 5.08	
	<i>Lactobacillus</i> spp.				
	G1	G2	L1	L2	Mean
	1	4.54 ± 0.34 <sup>Bb</sup>	6.98 ± 0.91 <sup>Aa</sup>	8.42 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	7.04 ± 0.24 <sup>Aa</sup>
21	6.96 ± 0.02 <sup>Aa</sup>	6.98 ± 0.13 <sup>Aa</sup>	7.08 ± 0.01 <sup>Ab</sup>	6.85 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	6.97 ± 0.06
Mean	5.75 ± 1.71	6.98 ± 0.01	7.75 ± 0.95	6.95 ± 0.06	

<sup>A,B</sup> Means followed by different letters represent significant differences between the means of kefir samples for the same storage day

<sup>a, b</sup> Means followed by different letters represent significant differences between the means of storage day for the same kefir sample ( $P \leq 0.05$ ). SE: Standard error. G1 and G2: kefir samples produced by kefir grains, L1 and L2: kefir samples produced by lyophilized starter cultures

### 3.3. Volatile Compounds of Kefir Samples

Thirteen aroma- active compounds were detected in kefir samples in the present study. Ketones, sulfur, esters and acids are major aroma active compounds in kefir samples and their intensities varied depend on kefir samples (Table 4).

Formation of diacetyl in dairy products is mainly due to lactose and citrate metabolism of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. (Güneşer & Karagül-Yüceer, 2011). Diacetyl was determined at higher intensity than other flavor compounds except butyric acid in all kefir samples. In general, the intensity of diacetyl of kefir samples produced from lyophilized culture was higher than those produced from kefir grain. 1-octen-3-ol is formed by lipid oxidation of milk fat and associated with mushroom or metallic flavor (Karagül-Yüceer et al., 2009). 1-octen-3-ol was determined at low intensities in all kefir samples except L1. Sample G1 had higher intensity of this flavor than others. Dimethyl sulfur and methional were associated cooked and boiled potato flavors, respectively. Both components were known as Strecker degradation products and are considered as off-flavor for dairy products (Karagül-Yüceer et al., 2009). Dimethyl sulfur was determined only in sample G1, while methional was determined in all kefir samples. In terms of methional intensity, kefir samples produced from kefir grains had higher values than those produced from starter culture.

Ester type flavor compounds are formed through the reaction of acids with alcohols. This reaction has important role in the metabolism of yeast to produce fruity flavors in the fermentation stages. Ethyl-3-methyl butyrate, which is associated fermented creamy and fruity flavors, was identified only in kefir samples produced by using kefir grains with similar intensities. This observation could be related to the count of yeast in kefir grains due to natural kefir grains contains higher yeast count than that of freeze-dried kefir cultures.

Acidic compounds determined in all kefir samples were acetic acid (vinegar), butyric acid (rancid) and hexanoic acid (cheesy). All of these compounds were associated with sharp flavor and bacterial group contained in dairy products and caused acidity came from fatty acid. Several dairy products like cheese, cream, milk powder had these acidic flavor compounds. It is considered that butyric acid is major volatile acidic compound and responsible for rancid and sour flavor of fermented dairy products (Güneşer & Karagül-Yüceer, 2010; Karagül-Yüceer, Drake, & Cadwallader, 2001;). Butyric acid and acetic acid were found in both kefir groups. Aroma intensities of acetic acid were lower in kefir samples produced by kefir grains than others. However butyric acid intensities of the kefir samples were similar. Other compounds including maltol and homofuraneol which were associated burnt sugar or caramel like flavor, were only determined L1 and L2 samples, respectively. They can be formed from lactose in dairy products by heat treatment (Cadwallader & Singh, 2009).

Table 4

Aroma-active compounds determined in kefir samples at the first day of storage

No	Compound	RI <sup>a</sup>	Aroma	Aroma intensity <sup>b</sup> (Mean ±SE)			
				G1	G2	L1	L2
1	Dimethyl sulphur	<500	Sulphur, cooked potato	1.00 ± 0.01	ND	ND	ND
2	Diacetyl	571	Buttery	5.00 ± 0.71	4.50 ± 0.71	6.00 ± 0.71	5.50 ± 0.71
3	Acetic acid	618	Vinegar, sour	1.50 ± 0.01	1.00 ± 0.01	3.00 ± 0.01	2.00 ± 0.01
4	Unknown 1	796	Dust/concrete	ND	ND	1.50 ± 0.71	ND
5	Butyric acid	806	Rancid	5.50 ± 0.71	5.50 ± 1.14	6.25 ± 0.35	5.00 ± 0.01
6	Ethyl-3-methyl butyrate	860	Fruity, creamy	2.00 ± 1.41	2.00 ± 0.35	ND	ND
7	Unknown 2	861	Burnt sugar	ND	ND	1.50 ± 0.71	ND
8	Methional	912	Boiled potato	7.25 ± 0.35	4.00 ± 1.41	3.00 ± 1.41	6.00 ± 0.71
9	Unknown 3	937	Rose	0.40 ± 0.57	ND	ND	-
10	1-octen 3-ol	986	Mushroom	1.50 ± 0.01	0.90 ± 0.14	ND	0.70 ± 0.21
11	Maltol	1030	Burnt sugar, caramel	ND	ND	0.80 ± 0.01	ND
12	Hexanoic acid	1046	Cheesy	0.50 ± 0.71	ND	ND	ND
13	Homofuraneol	1165	Burnt sugar	ND	ND	ND	1.50 ± 0.71

ND: not detected; <sup>a</sup>RI values calculated from gas chromatography–olfactometry results on HP-5 column, <sup>b</sup>Mean aroma intensities (post-peak intensity, 10-point scale) of kefir samples given by two sniffers on DB-5 columns. SE: Standard error. G1 and G2: kefir samples produced by kefir grains, L1 and L2: kefir samples produced by lyophilized starter cultures

Total 23 volatile compounds including ketones, aldehydes, acids, alcohols, esters, and lactones were identified in kefir samples. Sixteen of these volatiles were determined in all kefir samples (Table 5).

Acetoin, 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone as ketones were determined in kefir samples. Acetoin was determined in all kefir samples through the storage. At the 1<sup>st</sup> and 21<sup>th</sup> days of the storage, the acetoin content of kefir samples ranged between 31.08 and 0.38 µg/100g. The highest acetoin content was determined in L2, although G2 sample had the lowest acetoin content. The amount of acetoin increased in G2 sample during storage while a decrease in acetoin content was determined in other kefir samples. Similarly, [Güzel-Seydim et al. \(2000\)](#) found that acetoin content of kefir decreased from 25 µg/g to 16 µg/g during the storage. 2-heptanone was determined as another ketone in all kefir samples. In general, the amount of 2-heptanone was higher in kefir samples produced from kefir grains than those of produced from starter culture. The highest amount of 2-heptanone as 2.81 µg/100g was determined in G2 sample on the 21<sup>st</sup> day storage and the lowest amount of 2-heptanone was determined in L2 sample on the 1<sup>st</sup> day of the storage. G1, G2 and L1 kefir samples were similar in terms of the amount of 2-nonanone on the 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> day of the storage. The content of 2-nonanone in kefir samples changed from 0.06 µg/100g to 0.53 µg/100g. The amount of 2-undecanone did not change in all kefir samples during storage.

Development of typical sour taste and acidic flavor of the kefir is the result of the acid fermentation of microbial flora in the kefir. In this study, several acidic compounds including acetic acid, butyric acid, 3-methyl butyric acid, hexanoic acid and octanoic acid were determined in kefir samples. The amount of acetic acid in kefir samples were the highest compared to other acids. Moreover, the amount of acetic acid increased during storage and kefir samples produced by using starter culture had higher acetic acid than those produced from kefir grains.

Table 5

Volatile components ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) quantified using by solid phase microextraction (SPME)-GC-MS in kefir samples at the 1<sup>st</sup> and 21<sup>th</sup> days of storage

No	Volatile compounds	RI <sup>a</sup>	Kefir samples (Mean $\pm$ SE)							
			G1		G2		L1		L2	
			1 <sup>st</sup> day	21 <sup>th</sup> day	1 <sup>st</sup> day	21 <sup>th</sup> day	1 <sup>st</sup> day	21 <sup>th</sup> day	1 <sup>st</sup> day	21 <sup>th</sup> day
1	Acetic acid	598	137.36 $\pm$ 1.33	197.31 $\pm$ 25.84	110.18 $\pm$ 5.27	147.46 $\pm$ 0.83	153.75 $\pm$ 33.91	233.59 $\pm$ 1.86	177.19 $\pm$ 2.13	220.60 $\pm$ 23.69
2	Acetoin	705	16.95 $\pm$ 1.29	18.03 $\pm$ 4.41	2.61 $\pm$ 2.29	0.38 $\pm$ 0.34	15.42 $\pm$ 7.31	14.70 $\pm$ 3.38	31.08 $\pm$ 3.93	25.80 $\pm$ 10.31
3	Isoamyl alcohol	729	ND	ND	ND	5.82 $\pm$ 0.45	ND	ND	ND	ND
4	Butyric acid	817	46.13 $\pm$ 3.59	57.12 $\pm$ 4.42	51.80 $\pm$ 0.14	52.01 $\pm$ 14.81	42.97 $\pm$ 11.29	76.67 $\pm$ 8.77	64.63 $\pm$ 1.88	65.63 $\pm$ 6.65
5	3-methyl butyric acid	856	1.34 $\pm$ 0.82	1.55 $\pm$ 0.66	0.77 $\pm$ 0.12	2.04 $\pm$ 0.08	0.19 $\pm$ 0.11	1.68 $\pm$ 0.21	0.80 $\pm$ 0.57	0.81 $\pm$ 0.26
6	Styrene	885	ND	ND	0.13 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.20	ND	ND	ND	ND
7	2-Heptanone	890	1.65 $\pm$ 0.02	2.28 $\pm$ 0.20	2.50 $\pm$ 0.12	2.81 $\pm$ 1.97	1.47 $\pm$ 0.52	2.07 $\pm$ 0.21	0.44 $\pm$ 0.18	0.72 $\pm$ 0.23
8	2-Heptanol	898	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.63 $\pm$ 0.18	1.42 $\pm$ 1.17
9	Methoxy phenyl oxime	909	1.00 $\pm$ 0.01	1.25 $\pm$ 0.15	1.43 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.16	0.74 $\pm$ 0.34	0.96 $\pm$ 0.15	1.08 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.09
10	Hexanoic acid	1007	100.44 $\pm$ 3.83	114.71 $\pm$ 19.82	108.34 $\pm$ 2.34	110.07 $\pm$ 30.17	88.43 $\pm$ 16.77	131.04 $\pm$ 18.42	114.85 $\pm$ 5.55	127.88 $\pm$ 16.87
11	Heptanoic acid	1075	0.83 $\pm$ 0.59	1.01 $\pm$ 0.56	0.64 $\pm$ 0.06	2.05 $\pm$ 0.50	1.57 $\pm$ 0.57	1.63 $\pm$ 0.07	0.57 $\pm$ 0.13	1.24 $\pm$ 0.96
12	2-Nonanone	1086	0.35 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.16	0.47 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.26	0.33 $\pm$ 0.10	0.39 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
13	Nonanal	1094	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.20 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.16
14	Pristane	1145	0.93 $\pm$ 0.13	0.90 $\pm$ 0.22	1.14 $\pm$ 0.04	1.70 $\pm$ 0.97	0.82 $\pm$ 0.25	1.09 $\pm$ 0.09	1.21 $\pm$ 0.09	1.61 $\pm$ 0.39
15	Octanoic acid	1174	19.23 $\pm$ 3.10	20.68 $\pm$ 7.65	23.30 $\pm$ 1.79	21.76 $\pm$ 5.19	16.85 $\pm$ 3.16	21.11 $\pm$ 2.01	18.72 $\pm$ 0.50	27.11 $\pm$ 5.77
16	Nonanoic acid	1261	2.84 $\pm$ 1.37	5.05 $\pm$ 0.35	0.55 $\pm$ 0.03	8.34 $\pm$ 3.66	5.06 $\pm$ 1.64	5.64 $\pm$ 2.11	0.41 $\pm$ 0.21	5.54 $\pm$ 3.01
17	2-undecanone	1284	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
18	Triacetin	1339	0.06 $\pm$ 0.06	0.80 $\pm$ 0.11	0.03 $\pm$ 0.03	1.53 $\pm$ 0.44	0.01 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.36	0.01 $\pm$ 0.01	1.26 $\pm$ 0.43
19	n-Decanoic acid	1356	5.88 $\pm$ 4.78	2.67 $\pm$ 1.95	2.35 $\pm$ 0.09	2.36 $\pm$ 0.21	1.70 $\pm$ 0.46	1.74 $\pm$ 0.65	1.52 $\pm$ 0.01	5.15 $\pm$ 2.28
20	$\delta$ -Decalactone	1494	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
21	Dodecanoic acid	1549	0.30 $\pm$ 0.25	0.40 $\pm$ 0.09	0.03 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.01	ND	ND	ND	0.19 $\pm$ 0.10
22	Tetradecanoic acid	1745	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.12 $\pm$ 0.12
23	Hexadecanoic acid	1944	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08 $\pm$ 0.08

ND: not detected; <sup>a</sup>:RI (Retention Index) values calculated from gas chromatography–mass spectrometry results on HP-5 MS column. SE: Standard error. G1 and G2: kefir samples produced by kefir grains, L1 and L2: kefir samples produced by lyophilized starter cultures

Butyric acid is responsible from rancid aroma in dairy products and determined in all kefir samples during storage. The highest butyric acid content was determined in sample L1 at the end of storage. Hexanoic acid is associated with cheesy and rancid flavor in food products and is responsible for pungent sour taste. The amount of hexanoic acid increased during storage in all kefir samples.

Octanoic acid is the main aroma compound in milk, and it has similar acid/sour characteristic with hexanoic acid. The amount of octanoic acid increased in G1, L1 and L2 samples during storage. However, the amount of this acid decreased in G2 sample through storage. The highest octanoic acid amount was determined in L2 samples in 21<sup>th</sup> day of the storage.

Yeast flora in kefir has important role in alcohol fermentation. Isoamyl alcohol and 2-heptanol were only determined in G2 and L2 samples, respectively. Especially, it was thought that detection of isoamyl alcohol was associated with the highest yeast count in G2 sample on the 21<sup>th</sup> day. The amount of 2-heptanol increased in L2 sample through 21 days of the storage.

Esters are generated by interaction of fatty acids with alcohols at mild process parameters and low cost. Aromatic esters are responsible to natural fruity and flower characteristics in foods (Sa et al., 2017). Only, triacetin, triester of acetic acid and glycerol, as ester was determined in kefir samples. The amount of triacetin increased in all kefir samples through the storage. The highest amount of triacetin was determined in G2 sample on 21<sup>th</sup> day of the storage.

The other group of flavor compounds in dairy products is lactones. Lactones are formed by heat treatment of  $\gamma$ - or  $\delta$ -hydroxy acids and triglycerides. Peach, sweet and milk-like flavor are associated with lactones in dairy products (Karagül-Yüceer et al., 2009). In this study, all kefir samples had  $\delta$ -decalactone during the storage.

### 3.4. Sensorial Characteristics of Kefir Samples

Sensory descriptors developed by the panel members for the kefir samples were shown in Table 6. “Sour”, “sweet”, “salty” and “bite” were developed taste terms for kefir samples while “cooked” “creamy”, “fermented”, “animal like”, “dairy” and “yeast” were the aromatic terms. Similar sensory characteristic terms were determined in other dairy products (Güneşer & Karagül-Yüceer, 2011; İşleten & Karagül-Yüceer, 2006).

Effect of significant interaction between storage and kefir types was determined on the samples in terms of “cooked”, “fermented”, “dairy”, “yeast”, “sour”, “salty” and “bite”. Storage had significant effect on the creamy aroma of the kefir samples whereas animal like-aroma of the kefir samples was affected by culture type ( $P < 0.05$ ). According to these results, cooked and dairy aroma was found to be higher in kefir samples produced from starter culture at 1<sup>st</sup> day of the storage than those produced from kefir grain. Both aromas decreased in kefir samples produced by starter culture for 21 days storage, but the same aromas remained stable in kefir samples produced by kefir grains during storage. The highest fermented aroma was determined in L2 samples at 1<sup>st</sup> day of the storage while there were no significant differences in other kefir samples during storage. Similarly, the highest yeast aroma was determined in G1 sample at 1<sup>st</sup> day of the storage. At the 7<sup>th</sup> day of storage, the lowest value was determined in G1 while the highest value was observed in G2 samples in terms of yeast aroma. Changes in yeast aroma in sample G1 were significant during storage, while no significant differences were found in the other kefir samples. Moreover, the highest intensity of creamy in kefir samples was determined at the first day of the storage. After 7<sup>th</sup> day of storage, the intensity of creamy flavor did not change in the kefir samples. Animal like aroma was found to be higher in kefir samples produced from kefir grains than kefir samples produced from lyophilized culture.

Table 6  
Sensory attributes of kefir samples during storage

Storage (days)	Kefir samples (Mean ±SE)				Mean
	G1	G2	L1	L2	
Sour					
1	3.44 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	1.96 ± 0.21 <sup>Bab</sup>	2.32 ± 0.15 <sup>Ba</sup>	2.38 ± 0.13 <sup>Ba</sup>	2.53 ± 0.64
7	1.71 ± 0.08 <sup>Ab</sup>	2.44 ± 0.35 <sup>Aa</sup>	2.06 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	2.34 ± 0.21 <sup>Aa</sup>	2.14 ± 0.33
21	1.98 ± 0.12 <sup>Ab</sup>	1.73 ± 0.23 <sup>Ab</sup>	2.05 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	1.97 ± 0.38 <sup>Aa</sup>	1.93 ± 0.14
Mean	2.38 ± 0.93	2.04 ± 0.36	2.14 ± 0.15	2.23 ± 0.23	
Sweet					
1	1.86 ± 0.11	1.84 ± 0.04	2.24 ± 0.15	2.04 ± 0.04	2.00 ± 0.19
7	2.11 ± 0.19	1.90 ± 0.27	2.05 ± 0.05	2.11 ± 0.02	2.05 ± 0.10
21	1.99 ± 0.11	1.88 ± 0.08	1.69 ± 0.02	1.84 ± 0.09	1.85 ± 0.12
Mean	1.99 ± 0.13	1.87 ± 0.03	1.99 ± 0.28	2.00 ± 0.14	
Salty					
1	1.21 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	0.71 ± 0.05 <sup>Bc</sup>	0.75 ± 0.01 <sup>Ba</sup>	0.65 ± 0.15 <sup>Bb</sup>	0.83 ± 0.26
7	1.12 ± 0.11 <sup>ABab</sup>	1.25 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	0.93 ± 0.03 <sup>Ba</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>ABa</sup>	1.08 ± 0.14
21	0.93 ± 0.02 <sup>Ab</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>Ab</sup>	0.94 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	1.01 ± 0.11 <sup>Aa</sup>	0.97 ± 0.04
Mean	1.09 ± 0.14	0.98 ± 0.27	0.87 ± 0.11	0.89 ± 0.21	
CO <sub>2</sub> (bite)					
1	1.71 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>Ba</sup>	1.69 ± 0.12 <sup>Aa</sup>	2.01 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	1.46 ± 0.70
7	0.36 ± 0.03 <sup>Bb</sup>	0.36 ± 0.06 <sup>Ba</sup>	0.60 ± 0.03 <sup>ABb</sup>	0.91 ± 0.03 <sup>Ab</sup>	0.56 ± 0.26
21	0.59 ± 0.05 <sup>Bb</sup>	0.60 ± 0.18 <sup>Ba</sup>	0.97 ± 0.03 <sup>ABb</sup>	1.06 ± 0.27 <sup>Ab</sup>	0.81 ± 0.25
Mean	0.89 ± 0.72	0.47 ± 0.12	1.09 ± 0.55	1.33 ± 0.60	
Cooked					
1	3.11 ± 0.07 <sup>Ba</sup>	2.61 ± 0.11 <sup>Cb</sup>	3.92 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	3.97 ± 0.13 <sup>Aa</sup>	3.40 ± 0.66
7	3.30 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	3.19 ± 0.31 <sup>Aa</sup>	3.25 ± 0.08 <sup>Ab</sup>	3.30 ± 0.05 <sup>Ab</sup>	3.26 ± 0.05
21	3.23 ± 0.02 <sup>Aa</sup>	3.15 ± 0.19 <sup>Aa</sup>	3.23 ± 0.06 <sup>Ab</sup>	3.15 ± 0.02 <sup>Ab</sup>	3.19 ± 0.05
Mean	3.21 ± 0.10	2.98 ± 0.32	3.47 ± 0.39	3.47 ± 0.44	
Creamy					
1	4.07 ± 0.19	3.75 ± 0.10	5.46 ± 0.25	5.23 ± 0.27	4.63 ± 0.84 <sup>a</sup>
7	4.23 ± 0.19	3.65 ± 0.52	4.38 ± 0.42	4.46 ± 0.13	4.18 ± 0.37 <sup>β</sup>
21	4.23 ± 0.02	3.78 ± 0.19	3.99 ± 0.32	3.94 ± 0.27	3.99 ± 0.19 <sup>β</sup>
Mean	4.18 ± 0.09	3.73 ± 0.07	4.61 ± 0.76	4.54 ± 0.65	
Fermented					
1	5.55 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	3.86 ± 0.15 <sup>Bb</sup>	5.55 ± 0.21 <sup>Aa</sup>	5.82 ± 0.11 <sup>Aa</sup>	5.20 ± 0.90
7	5.09 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	5.86 ± 0.23 <sup>Aa</sup>	5.07 ± 0.19 <sup>Aa</sup>	5.38 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	5.35 ± 0.37
21	5.11 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	4.65 ± 0.60 <sup>Ab</sup>	5.01 ± 0.30 <sup>Aa</sup>	5.34 ± 0.46 <sup>Aa</sup>	5.03 ± 0.29
Mean	5.25 ± 0.26	4.79 ± 1.01	5.21 ± 0.30	5.51 ± 0.27	
Animal-like					
1	0.71 ± 0.17	0.85 ± 0.07	0.02 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.42 ± 0.42
7	1.61 ± 0.06	2.11 ± 0.98	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.93 ± 1.09
21	0.33 ± 0.01	1.80 ± 0.55	ND	ND	0.53 ± 0.86
Mean	0.88 ± 0.66 <sup>x</sup>	1.59 ± 0.66 <sup>x</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>y</sup>	0.03 ± 0.05 <sup>y</sup>	
Dairy					
1	2.88 ± 0.13 <sup>Bb</sup>	3.88 ± 0.09 <sup>ABa</sup>	4.48 ± 0.40 <sup>Aa</sup>	4.17 ± 0.13 <sup>Aa</sup>	3.85 ± 0.69
7	5.51 ± 0.42 <sup>Aa</sup>	4.36 ± 0.65 <sup>ABa</sup>	4.13 ± 0.09 <sup>Ba</sup>	4.11 ± 0.06 <sup>Ba</sup>	4.53 ± 0.67
21	3.88 ± 0.09 <sup>Ab</sup>	3.80 ± 0.47 <sup>Aa</sup>	1.59 ± 0.09 <sup>Bb</sup>	1.59 ± 0.09 <sup>Bb</sup>	2.72 ± 1.30
Mean	4.09 ± 1.33	4.01 ± 0.30	3.40 ± 1.58	3.29 ± 1.47	
Yeast					
1	4.57 ± 0.19 <sup>Aa</sup>	2.98 ± 0.27 <sup>Ba</sup>	2.70 ± 0.02 <sup>Ba</sup>	3.01 ± 0.13 <sup>Ba</sup>	3.32 ± 0.85
7	1.00 ± 0.01 <sup>Bc</sup>	2.79 ± 1.16 <sup>Aa</sup>	1.84 ± 0.09 <sup>ABa</sup>	1.82 ± 0.07 <sup>ABa</sup>	1.86 ± 0.73
21	2.44 ± 0.02 <sup>Ab</sup>	2.57 ± 0.40 <sup>Aa</sup>	2.03 ± 0.11 <sup>Aa</sup>	2.15 ± 0.27 <sup>Aa</sup>	2.30 ± 0.25
Mean	2.67 ± 1.80	2.78 ± 0.21	2.19 ± 0.45	2.33 ± 0.61	

ND: not detected; <sup>x-y</sup> Means followed by different letters represent significant differences in kefir samples for animal like aroma ( $P \leq 0.05$ ). <sup>a-β</sup> Means followed by different letters represent significant differences in kefir samples for creamy aroma ( $P \leq 0.05$ ). <sup>a-c</sup> Means followed by different letters represent significant differences in the same kefir types during storage ( $P \leq 0.05$ ). <sup>A-B</sup> Means followed by different letters represent significant differences among the kefir samples ( $P \leq 0.05$ ). G1 and G2: kefir samples produced by kefir grains, L1 and L2: kefir samples produced by lyophilized starter cultures



Sour, salty and bite intensities changed depending on kefir types during storage. No significant differences were found among kefir samples in terms of sweet taste. The intensity of sweet taste in kefir samples ranged between 1.69 to 2.24 scores. On the 1<sup>st</sup> day of the storage, G2, L1 and L2 samples had similar sensory scores with regards to sour and salty taste while G1 sample had the highest score for the same taste attributes. After 1<sup>st</sup> day of storage, perception of sour and salty tastes increased in G2, L1 and L2 samples and there were not significant differences were determined in sour and salty tastes of all kefir samples through the end of storage. CO<sub>2</sub> can be formed by microbial metabolism in some dairy foods. The lowest bite score was determined in G2 sample at the first day of the storage and this sensory property was not change in G2 samples during storage. In case of other kefir samples, bite perception of the panelists decreased through 21 days of the storage. This could be related to the decreasing of CO<sub>2</sub> production by microorganisms.

Consumer perception of the samples were evaluated by 9-point hedonic scale. The differences between the evaluated sensory properties were mostly due to consistency and taste/flavor attributes. Moreover, statistically significant difference ( $P \leq 0.05$ ) was also observed in the appearance of G2 sample with the lowest score (5.23). The higher sensory scores were found in samples produced with lyophilized cultures as considered from consistency and taste/flavor scores. For example, taste/flavor scores of L1 and L2 samples were between 6.66 and 6.41, while samples G1 and G2 had 6.14 and 4.49 scores, respectively.

Kefir samples belong to G groups have the lowest viscosity during the storage may be associated with the lowest consistency scores in G2 samples. Similar findings to our results for kefir samples have been reported. In a study, some sensory attributes of kefir samples produced using kefir grain and lyophilized cultures were evaluated during the 9-day storage and reported that no significant difference in appearance and consistency scores was observed between tested kefir samples ([Ersoy & Uysal, 2003](#)).

[Güneşer & Karagül-Yüceer \(2010\)](#) used cow and goat milk combinations (100% cow milk, 75% cow milk+25% goat milk, 50% cow milk+50% goat milk, 100% goat milk) for the formulation of four different kefir samples. Researchers compared the appearance and consistency scores of all kefir formulations but did not find the statistically significant difference. [Ersoy & Uysal \(2003\)](#) and [Yıldız \(2009\)](#) reported that the storage period had negative effect (reducing scores) on the taste-flavor attributes of kefir samples.

Consumer preference of the sample L1 by the panelists is higher than the samples L2, G1 and G2. Sample G2 had the least preferred kefir. We believe the reason behind the observed the lowest overall acceptance score of G2 might be related to lower taste and aroma attributes including sour, sweet, CO<sub>2</sub> (bite), creamy, fermented, and higher scores of animal-like and yeast aromas.

#### 4. Conclusion

In this study, physicochemical, microbiological properties, and aroma compounds of kefir samples varied by using the kefir grains or lyophilized cultures. Particularly, using lyophilized culture ensured more preferred results. Intensities of diacetyl and acetic acid were higher in samples with lyophilized cultures. Consumer acceptance scores of the samples with lyophilized cultures were higher than samples with grain. Furthermore, the only fermentation with kefir grain was not efficient enough to be liked in terms of consistency, taste/flavor, and appearance of kefir samples.

## Acknowledgement

This study was funded by the Scientific Research Council of Çanakkale Onsekiz Mart University with grant number FYL:2014-339.

## Author Contributions

İrem Şen Dağ: Collected data and performed the analysis in her master thesis.

Buket Aydeniz-Güneşer: Performed statistical analysis and wrote the paper.

Yonca Karagül-Yüceer: Designed the experiments, contributed to review of the manuscript and editing as a corresponding author.

## Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. (2013). Kefir and health: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 422-434. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.540360>
- AOAC, (2000). Ash of milk (Gravimetric method)-method 945.46. In W. Horowitz (Ed.) Official methods of analysis of AOAC International (18th ed.). (pp. 19-21). Gaithersburg MD USA: AOAC International. Retrieved from: [http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main\\_page=product\\_info&products\\_id=1155](http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=1155)
- Atamer, M., & Sezgin, E. (1986). Yoğurtlarda kurumadde artırımının pıhtının fiziksel özelliklerine etkisi. *Gıda*, 11, 327-331. <https://doi.org/6803/91480>
- Bradley, R. L., Arnold, Jr. E., Barbano, Jr. D. M., Semerad, R. G., Smith, D. E., & Vines, B. K. (1992). Chemical and physical methods. In R. T. Marshall (Ed.) *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association, Washington, USA. Retrieved from: <http://www.sci-epub.com/reference/43176>
- Cadwallader, K. R., & Singh, T. K. (2009). Flavours and off-flavours in milk and dairy products. In P. L. McSweeney P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry* (pp 631-690). New York, USA. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_14)
- Chandan, R. C. (2013). History and Consumption Trends. Manufacturing Yogurt and Fermented Milks. In R. T. Marshall (Ed.), *Standard methods for the examination of dairy product, chemical and physical methods* (pp. 433-531). Washington, USA. <https://doi.org/10.1002/9781118481301>
- Cheng, H. (2010). Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(10), 938-950. <https://doi.org/10.1080/10408390903044081>
- Codex Alimentarius Commission, (2003). *Codex standard for fermented milks*. Alimentarius Commission Joint FAO/WHO Food Standards Programme and World Health Organization. No. CODEX Stan 243-2003. Retrieved from: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS\\_243e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243e.pdf)
- Dave, R., & Shah, N. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 79, 1529-1536. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76513-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76513-X)
- Davras, F., Guzel-Seydim, Z. B., & Tas, T. K. (2018). Immunological effects of Kefir produced from Kefir grains versus starter cultures when fed to mice. *Functional Foods in Health and Disease*, 8(8), 412-423. <https://www.ffhdj.com/index.php/ffhd/article/view/533/RemoteURL>

- Ebner, J., Arslan, A. A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., & Pischetsrieder, M. (2015). Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of Proteomics*, 117, 41-57. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.005>
- Erdogan, F. S., Ozarslan, S., Guzel-Seydim, Z. B., & Taş, T. K. (2019). The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. *Food Research International*, 115, 408-413. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.080>
- Ersoy, M., & Uysal, H. (2003). Süttozu, peyniraltı suyu tozu ve yayıkaltı karışımları ile üretilen kefirlerin özellikleri üzerine bir araştırma II: Bazı fiziksel ve duyuşal özellikler, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1), 79-86. <http://dx.doi.org/1018-8851>
- Güneşer, O. & Karagül-Yüceer, Y., (2010). Keçi sütünün kefir üretiminde kullanılması: Fiziksel, kimyasal ve duyuşal özellikler, *Ulusal Keçicilik Kongresi* (pp. 336-342), Çanakkale, Turkey. Retrieved from: [https://www.researchgate.net/publication/288850630\\_Keci\\_sutunun\\_kefir\\_uretiminde\\_kullanilmasi\\_Fiziksel\\_kimyasal\\_ve\\_duyusal\\_ozellikler](https://www.researchgate.net/publication/288850630_Keci_sutunun_kefir_uretiminde_kullanilmasi_Fiziksel_kimyasal_ve_duyusal_ozellikler)
- Güneser, O., & Karagül-Yuceer, Y. (2011). Characterisation of aroma-active compounds, chemical and sensory properties of acid-coagulated cheese: Circassian cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 517-525. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00703.x>
- Güzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., & Greene, A. K. (2000). Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *Journal of Dairy Science*, 83, 275-277. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74874-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74874-0)
- Güzel-Seydim, Z. B., Wyffels, J. T., Seydim, A. C., & Greene, A. K. (2005). Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 25-29. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2005.00177.x>
- Güzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
- IDF, (1997). *Standard I. D. F. 149A Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB). Standard of identity*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation. Retrieved from: <https://www.iso.org/standard/44069.html>
- İşleten M, & Karagül-Yüceer Y. (2006). Effects of dried dairy ingredients on physical and sensory properties of nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 89, 2865-2872. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72559-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72559-0)
- Karagözlü, C. (1990). *Farklı ısı işlem uygulanmış inek sütlerinden kefir kültürü ve tanesi ile üretilen kefirlerin dayanıklılığı ve nitelikleri üzerine araştırmalar (In Turkish)* (Unpublished master's thesis). Ege University, İzmir, Turkey.
- Karagül-Yüceer, Y., Drake, M., & Cadwallader, K. R. (2001). Aroma-active components of nonfat dry milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2948-2953. <https://doi.org/10.1021/jf0009854>
- Karagül-Yüceer, Y., Tuncel, B., Güneser, O., Engin, B., İseten, M., Yasar, K., & Mendes, M. (2009). Characterization of aroma-active compounds, sensory properties and proteolysis in Ezine cheese. *Journal of Dairy Science*, 92, 4146-4157. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2124>
- Kök-Taş, T., Seydim, A. C., Özer, B., & Guzel-Seydim, Z. B. (2013). Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*, 96, 780-789. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5753>
- Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Vlieg, J. H., Ursing, B. M., Boekrost, J., Smit, B. A., Ayad, E. H. E., Smit, G., & Siezen, R. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: Predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12, 111-121. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00132-7)

- Kussendrager, K. D., & Van Hooijdonk, A. C. M. (2007). Lactoperoxidase: Physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84, 19-25. <https://doi.org/10.1017/S0007114500002208>
- Leite, A. M. D. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 341-349. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
- Liu, J. R., & Lin, C. W. (2000). Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *Journal of Food Science*, 65(4), 716-719. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16078.x>
- Lv, J. P., & Wang, L. M. (2009). Bioactive components in kefir and koumiss. In *Bioactive components in milk and dairy products*. Young W, ed. Singapore: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780813821504>
- Magalhães, K. T., Dragone, G., De Melo Pereira, G. V., Oliveira, J. M., Domingues, L., Teixeira, J. A, Silva, J. B. A., & Schwan, R. F. (2011). Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry*, 126, 249-253. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.012>
- Meilgaard, M., Civille, G. V. & Carr, B. T. (1999). *Descriptive analysis techniques, sensory evaluation Techniques* (3<sup>rd</sup>edn). Boca Raton, F, USA: CRC Press. <https://doi.org/10030917645>
- Mulder, A. M., Connellan, P. A., Oliver, C. J., Morris, C. A., & Stevenson, L. M. (2008). Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. *Nutrition Research*, 28, 583-589. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.05.007>
- NEN, (1969). Netherlands Standard 3059. Butyrometric Determination of the Fat Content of Cheese (Gerber van Gulik Method). *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 23, 214-220.
- Nielsen, B., Gürakan, G. C. & Ünlü, G. (2014). Kefir: A multifaceted fermented dairy product. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 123-135. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25261107/>
- Sa, A. G. A., de Meneses, A. C., de Araújo, P. H. H., & de Oliveira, D. (2017). A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004>
- Sevencan, N. O., Isler, M., Kapucuoglu, F. N., Senol, A., Kayhan, B., Kiztanir, S., & Kockar, M. C. (2019). Dose-dependent effects of kefir on colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Food Science, Nutrition*, 7(9), 3110-3118. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1174>
- Sherkat, F., Shamsi, K., & Arjmand, A. (2016). Fermented functional beverages (kefir, koumiss and ayran). In F. Shahidi, & C. Alasalvar (Ed.) *Handbook of Functional Beverages and Human Health*. Boca Raton, USA. Retrieved from: <https://www.routledgehandbooks.com/doi/10.1201/b19490-67>
- Sheskin, D. J. (2000). *Parametric and nonparametric statistical procedures*. New York, USA. Retrieved from: [http://fmipa.umri.ac.id/wp-content/uploads/2016/03/David\\_J.\\_Sheskin\\_David\\_Sheskin\\_Handbook\\_of\\_ParaBookFi.org\\_.pdf](http://fmipa.umri.ac.id/wp-content/uploads/2016/03/David_J._Sheskin_David_Sheskin_Handbook_of_ParaBookFi.org_.pdf)
- Şen, İ. & Karagül Yüceer, Y. (2019). Dane veya Liyofilize Kefir Kültürü Kullanılarak Peyniraltı Suyu İçeceği Üretimi ve Karakterizasyonu. *Akademik Gıda*, 17(3) 362-370, <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/856668>
- Ünlütürk, A., & Turantaş, F. (1996). *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi*. Retrieved from: <https://www.nadirkitap.com/gida-mikrobiyolojisi-uygulamaları-adnan-unluturk-fulya-turantas-kitap10756882.html>
- Yıldız F., 2009. *Farklı Yağ Oranlarının ve Farklı Starter Kültürlerin Kefirin Nitelikleri Üzerine Etkisi (In Turkish)* (Unpublished doctoral dissertation). Ankara University, Ankara, Turkey.



# Boundary Extraction Based on Dual Stream Deep Learning Model in High Resolution Remote Sensing Images

Özgün Akçay<sup>1\*</sup>, Ahmet Cumhur Kınacı<sup>2</sup>, Emin Özgür Avşar<sup>1</sup>, Umut Aydar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Geomatics Engineering, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup>Department of Computer Engineering, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

## Article History

Received: 07.04.2021

Accepted: 23.06.2021

Published: 20.09.2021

## Research Article


**Abstract** – Boundary extraction in remote sensing has an important task in studies such as environmental observation, risk management and monitoring urban growth. Although significant progress has been made in the different calculation methods proposed, there are issues that need improvement, especially in terms of accuracy, efficiency and speed. In this study, dual stream network architecture of three different models that can obtain boundary extraction by using normalized Digital Surface Model (nDSM), Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) and Near-Infrared (IR) band as the second stream, was explained. Model I is designed as the original HED, whereas the second stream of Model II, III, and IV use nDSM, nDSM + NDVI and nDSM + NDVI + IR, respectively. Thus, by comparing the models trained based on different data combinations, the contribution of different input data to the success of boundary extraction was revealed. For the training of the models, boundary maps produced from The International Society for Photogrammetry and Remote Sensing (ISPRS) Potsdam data set and input datasets augmented by rotation, mirroring and rotation were used. When the test results obtained from two-stream and multi-data-based models are evaluated, 11% higher recall values have achieved with Model IV compared to the original HED. The outcomes clearly revealed the importance of using multispectral band, height data and vegetation information as input data in boundary extraction beside commonly used RGB images.


**Keywords** – Boundary extraction, deep learning, orthophotos, photogrammetry, remote sensing


## 1. Introduction


The studies for automatic extraction of natural and man-made object boundaries from optical images obtained from aerial cameras and satellite sensors have been carried out by Geomatics and Computer vision disciplines for many years and are still up-to-date with increasing interest. Automatic object extraction, which is particularly one of the main topics in Photogrammetry and Remote Sensing (RS) disciplines, has a very important task in environmental monitoring, risk management, precision agriculture, and effective database updating for Geographic Information Systems. Different methods have been used in the semantic classification studies that started in the 80's until today. [Cheng et al. \(2016\)](#) includes a comprehensive review of the studies conducted in this field. Although significant progress has been made with the different algorithms and methods, there are issues that need improvement, especially in terms of accuracy, efficiency and speed.

While the extraction methods continue to improve, on the other hand, the increasing image resolutions in parallel with the developments in sensor technologies have made new researches in semantic classification studies necessary. Since the early satellite images with low spatial resolution generally did not allow object

<sup>1</sup>  akcay@comu.edu.tr

<sup>2</sup>  cumhur.kinaci@comu.edu.tr

<sup>3</sup>  ozguravsar@comu.edu.tr

<sup>4</sup>  umutaydar@comu.edu.tr

\*Corresponding Author



extraction, semantic classification studies were mostly carried out to obtain regional features. However, thanks to the increased spatial resolutions (SPOT, Pleiades, aerial photographs, etc.) as the result of the development in image technology, it became possible to automatically extract objects and determine object boundaries; studies have focused on these areas. On the other hand, the visibility of complex object geometries with high resolution necessitated the development of semantic classification methods. Automatic object extraction, which will form a basis for high-accuracy studies such as engineering projects, cadastral studies, through high-resolution remote sensing images and aerial photographs, is one of the most challenging issues in this field ([Han et al., 2017](#); [Altinoluk et al., 2020](#)).

In recent years, it has been observed that deep convolutional neural networks (DCNN) have an important place in semantic classification and object boundary extraction studies on remote sensing images. According to many researchers, the success of deep networks stems from their ability to learn end-to-end efficient matching between raw images and class labels ([Kinzie & Kuh, 2004](#); [Marmanis et al., 2018](#)). Many classifications and object extraction studies have been carried out on remote sensing images by using Deep Networks with different architectures. [Guo et al. \(2018\)](#) and [Yuan et al. \(2021\)](#) discusses the many deep learning methods used in remote sensing in detail. In these studies, the errors occurring especially at the object boundaries revealed the need for studies on the extraction of the boundaries that determine the linear object edges.

[Hariharan et al. \(2011\)](#) proposed a method using an image-based weighted feature vector with the object definition frame, also known as the activation window in order to determine the boundary lines belonging to the object. Then, the final boundary lines of the whole image were formed by combining the border lines obtained from the detected objects in different categories. The combination used in this study has formed the basis for deep learning methods in determining object boundaries. [Shen et al. \(2015\)](#) used a customized training method by classifying line data in convolutional networks into subclasses depending on their shapes. In this method, positive loss function based on all class assignments is used and the loss is dealt out among subclasses. Later, because the shapes of the sub-classes are different from each other, a different model parameter was determined for each subclass and these classes were trained.

The one of the most cited studies in the literature for border detection is the Holistically-nested Edge Detection (HED) method ([Xie & Tu, 2015](#)). In HED, holistic expression means that a network can obtain edge map directly from image input, and nested expression represents using side outputs. HED, which was created using the Deep Supervised Network structure ([Lee et al., 2015](#)) and pre-trained VGG network parameters, has provided significant improvements in object boundaries and edge detection. [Kokkinos \(2015\)](#) developed HED with a multi-scale approach that designs different dimensions of the image pyramid as a single HED.

Edge extraction is considered with different task descriptions in networks that can perform multiple tasks instead of a single task. In their study, [Kokkinos \(2017\)](#) developed a network called UBERNet, which is suitable for the need for training data in different content for different tasks including edge extraction and the need for increased computing load due to multitasking. UBERNet is a fully convolutional network designed with task-oriented special layers placed on the basis of the VGG network. Network highlights can be expressed as follows: Bringing together the upper layers and middle layers by skipping layers, and making use of the spatial knowledge of lower level neurons in edge extraction, reducing slow learning rates with batch normalization in the middle layers and applying extended convolution. [Chen et al. \(2016\)](#) used the low-level layers of the DeepLab network ([Chen et al., 2014](#)) for edge detection with semantic segmentation as well as edge estimation, and obtained the improved semantic map from the results with an end-to-end architecture. On the other hand, [Dai et al. \(2016\)](#) performed a semantic segmentation that is sensitive to each object instance, in other words, identifying the object instances separately. This architecture, which was developed as multitasking and end-to-end, revealed the object examples of a class by sharing the property maps of three separate tasks.



In another study on segment boundaries, Ultrametric Contour Map was obtained by combining the horizontal and vertical orientations of multi-scale border lines and feature maps created as side outputs of the convolution network (Maninis et al., 2017). Marmanis et al. (2018) tried to minimize the edge defects that occur as a result of semantic segmentation by defining the HED and SegNet architecture for the remote sensing images in an integrated network for spectral, DSM and nDSM datasets in a multi-scale. In this study, double-stream HED-H and Segnet-H architectures are proposed instead of classical architectures by including height data as the second input data in education. CaseNet, which aims to determine the classes to which the borderlines belong, was developed on the layer jump and ResNet architecture, which shares the category-dependent edge activations in the top convolution layer and combines them with the lower layer property map (Yu et al., 2017). This study identified edge semantics despite some class inconsistencies. Bokhovkin & Burnaev (2019) proposes a novel loss function, namely a differentiable surrogate of a metric accounting accuracy of boundary detection. In the study, validation of proposed loss function is carried out with various modifications of UNet architecture on a synthetic dataset as well as real-world data. Alam et. al. (2021) proposes an improved Encoder-Decoder deep learning model that combines SegNet with index pooling and adapted U-net for suitable for multi-targets semantic segmen-tation of RS images. In the study, it is stated that by index pooling it is possible to obtain a more clear details for the segmentation of the edges.

However, recent related works have not shown how remote sensing-oriented datasets such as near-infrared band, height information, vegetation index might contribute to boundary extraction in deep learning. In this study, a dual stream network architecture that is able to extract object boundaries utilizing nDSM, NDVI and IR as additional data types for the RGB band information is proposed. In addition, the contribution of data types to the success of boundary inference was revealed by comparing the models trained based on different data combinations.

## 2. Data Preparation

In this study, The Potsdam dataset, which has been accessed within the scope of the International Society for Photogrammetry and Remote Sensing - Working Group III/4 was used (Rottensteiner et al., 2012). The datasets include true orthophotos, Digital Surface Models (DSMs) and ground truths produced from true orthophoto mosaic. True orthophotos and DSMs are in 5 cm ground sampling distances, Universal Transverse Mercator (UTM) projection and WGS84 datum. True-orthophotos and DSMs are available in 38 pieces of 6000 x 6000 pixel sizes, and 24 training and 14 test ground truths are available in tiff image format. True orthophotos are presented as three different combinations of four bands with 8-bit spectral resolution: Red-Green-Blue-Infrared (RGBIR), Infrared-Red-Green (IRRG) and Red-Green-Blue (RGB). In addition to DSMs presented with values encoded in 32-bit float data type, Normalized Digital Surface Models (nDSMs) produced by subtracting surface heights from digital elevation models are also included as an image data in jpeg image format.

In the preparation of the data, considering GPU memory limits and unintentional memorization, the appropriate image size for the input data was determined as 800 x 800 pixels with a 150 pixels overlap. As a result of this approach, 81 input data were generated from each image of 6000 x 6000 pixels. On the other hand, data augmentation should be considered to expand limited datasets as it can improve the performance of deep learning models (Shorten and Khoshgoftaar, 2019). Particularly, the brightness values of RGB and IR data were changed by  $\pm 50\%$ , by predicting the effect of different image acquisition angles and reflection differences. Figure 1 depicts the effect of rotation, mirroring and contrast changes for an RGB image after augmentation was implemented. RGB, nDSM, NDVI, IR and label data were mirrored and the original and mirrored images were rotated 90, 180 and 270 degrees. Therefore, the original RGB, IR datasets and nDSM, NDVI, label datasets were augmented 24 times and 8 times, respectively. The number of datasets resulting from this approach is given in Table 1. All input data preparation processes were coded and carried out in GNU Octave environment.

Four different datasets RGB, nDSM, NDVI and IR extracted from the Potsdam benchmark were defined as input sets in the study. Single band IR datasets were sliced from the RGBIR images and NDVI datasets were calculated and produced using the first and fourth bands of RGBIR true orthophotos. To produce labels for boundary data, the segmented label data containing border information have been processed.

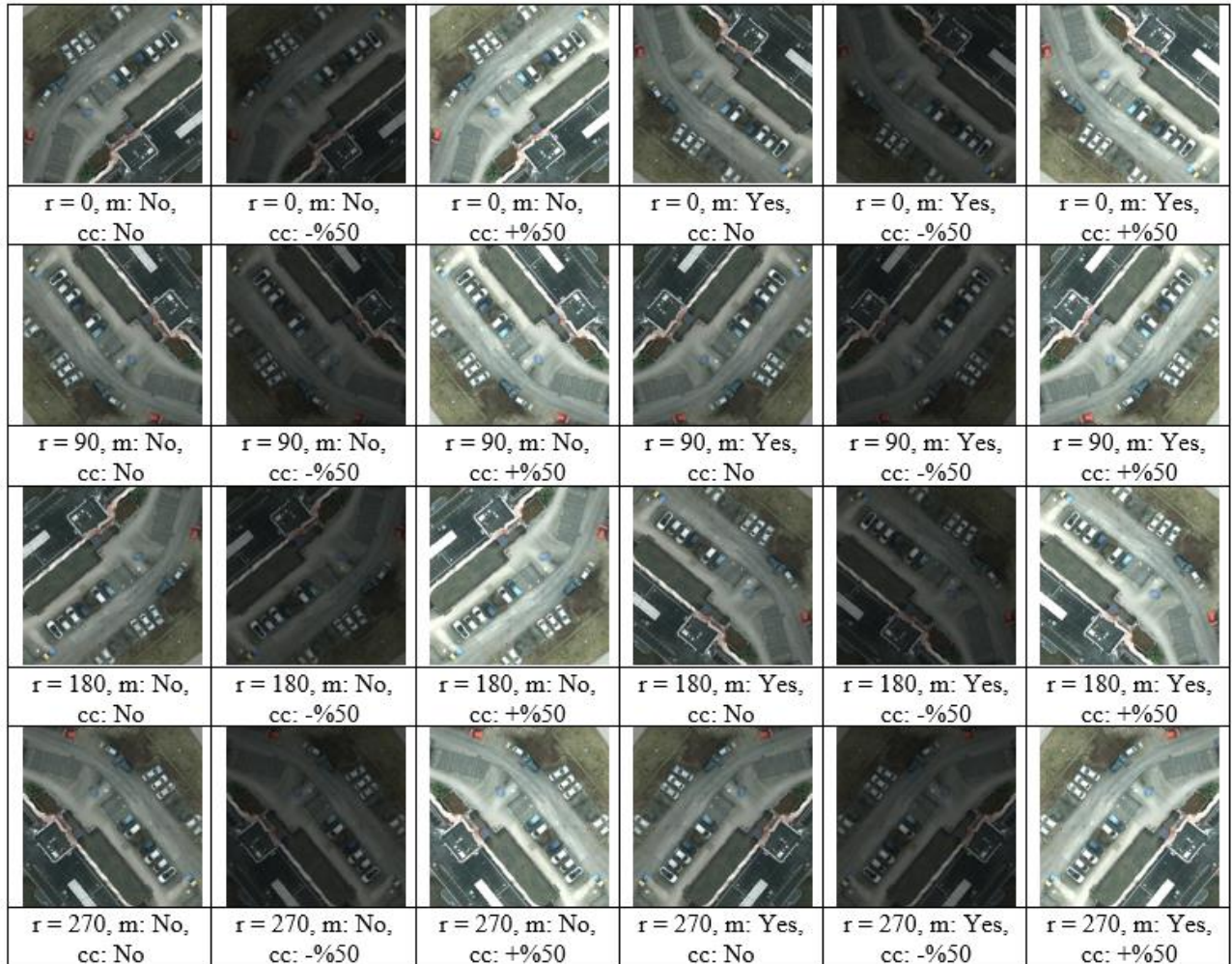


Figure 1. Augmentation result of an RGB image for rotation (r) in degrees, mirroring (m) and contrast change (cc)

Table 1  
Number of augmented samples

Data type	Rotation	Mirroring	Contrast	Number of samples
RGB	+	+	+	73872
nDSM	+	+	-	24624
NDVI	+	+	-	24624
IR	+	+	+	73872
Label	+	+	-	24624
Total				221616

### 3. Methods

Four models, Model I, II, III and IV have been discussed in this paper to determine data contribution to boundary extraction. Model I (Xie and Tu, 2015) is composed of one stream HED with RGB input, whereas Model II, III and IV are designed with one parallel stream getting additional inputs beside Model 1. Some

combinations of nDSM, NDVI and IR are utilized as inputs of Model II, III, and IV in their second streams, while RGB true orthophotos data is used as input in their first stream as shown in Table 2. Marmanis et al. (2018) also proposed a dual stream HED that is summarized in Figure 2; however they fed their model with only DSM datasets at second branch.

Table 2  
Input datasets for the models

Model no	First stream	Second stream
I	RGB	-
II	RGB	nDSM
III	RGB	nDSM + NDVI
IV	RGB	nDSM + NDVI + IR

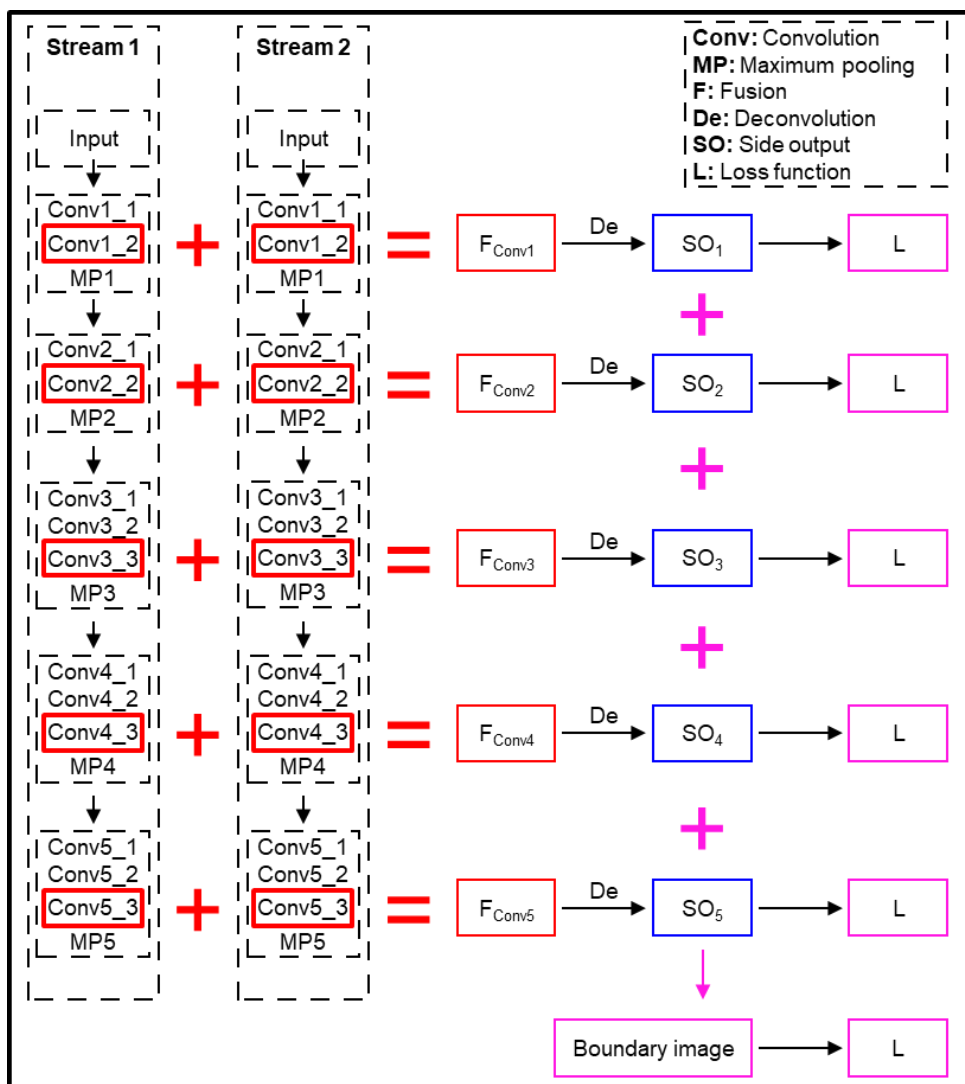


Figure 2. Dual stream model for object boundaries

By using different data types in the training of models, the effect of data other than RGB on the performance of the neural network was measured. The first stream was started with VGG-16 weights, but since there were no trained models of the input data to be used in the second stream of Models 2 and 3, the random initialization method was used initially. Since the input of the second flow of Model 4 is three-layered, the starting weights

were transferred from VGG-16 in this flow as well. Dual Stream HED (DS-HED) treats the convolution layers before each maximum pooling layer in both streams as a side output layer. Then, deconvolution and balanced cross-entropy loss function are applied to the side output layers, respectively, and the object boundary map is produced by combining these outputs as mentioned in [Xie and Tu \(2015\)](#). Two-stream net architecture consists of 26 convolutions, 10 maximum pooling, and 5 deconvolutions. All tests were carried out on a desktop computer including Intel(R) Core(TM) i7-7820X CPU @ 3.60GHz, 2xGeForce RTX 2080 Ti 128 GB RAM.

#### 4. Results and Discussion

Determining the most suitable model requires long processing times due to the very high size of the training data. In order to make a quick comparison between the performance of different models, an evaluation was made using training data sets produced from two selected layouts instead of the entire training data set. Initial model training experiments were accomplished by selecting the layouts 2-10 and 5-12 representing different characteristics such as buildings, roads and vegetation. Among the HED models trained for class boundaries inference, Model I trained with RGB was used as the base comparison model. The performances of Model II and Model III that were tested with nDSM and NDVI datasets added to the second stream, including RGB in the first stream, examine the success according to Model I. With Model IV, all data of nDSM, NDVI, IR were used for the second flow of HED. The graphs of the training and validation loss values generated during the training of all models depending on the increasing number of epochs are shown in [Figure 3](#). Since the number of training data was kept low in the preliminary evaluation, some deviations were observed in validation values due to the number of epochs. [Table 3](#), on the other hand, explains the number of data, the number of epochs and the accuracy results of the training based on the map data of all models 2-10 and 5-12.

True Positive (TP), True Negative (TN), False Positive (FP) and False Negative (FN) numerical values were considered to determine the error evaluation and accuracy rates between the predicted results and the actual values. With these numeric values, precision, sensitivity and f-score values were calculated with the following equations [4.1](#), [4.2](#) and [4.3](#).

$$precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (4.1)$$

$$recall = \frac{TP}{TP + FN} \quad (4.2)$$

$$f - score = 2 \times \frac{precision \times recall}{precision + recall} \quad (4.3)$$

Since the original boundary lines in the ground truth data are thinner and the predicted boundary lines are thicker, the pixel predictions that are not lines but within the near area of the original line are assigned as FP values and artificially increases the number of FP. In other words, since the difference in line thickness in the ground truth data with the boundary lines estimated by the models creates a much higher number of FP values compared to FN values, the recall criteria for boundary inference performance are more meaningful than the precision and f-score criteria. For this reason, especially high recall values were evaluated as the criterion for success, and it was observed that the Model IV reached the highest accuracy as explained in [Table 3](#). An increase of 11% was observed in recall values, when Model I were compared to Model IV. 11% rise in recall indicates that Model IV as one of our proposed DS-HED architectures outperformed Model I representing the original HED.

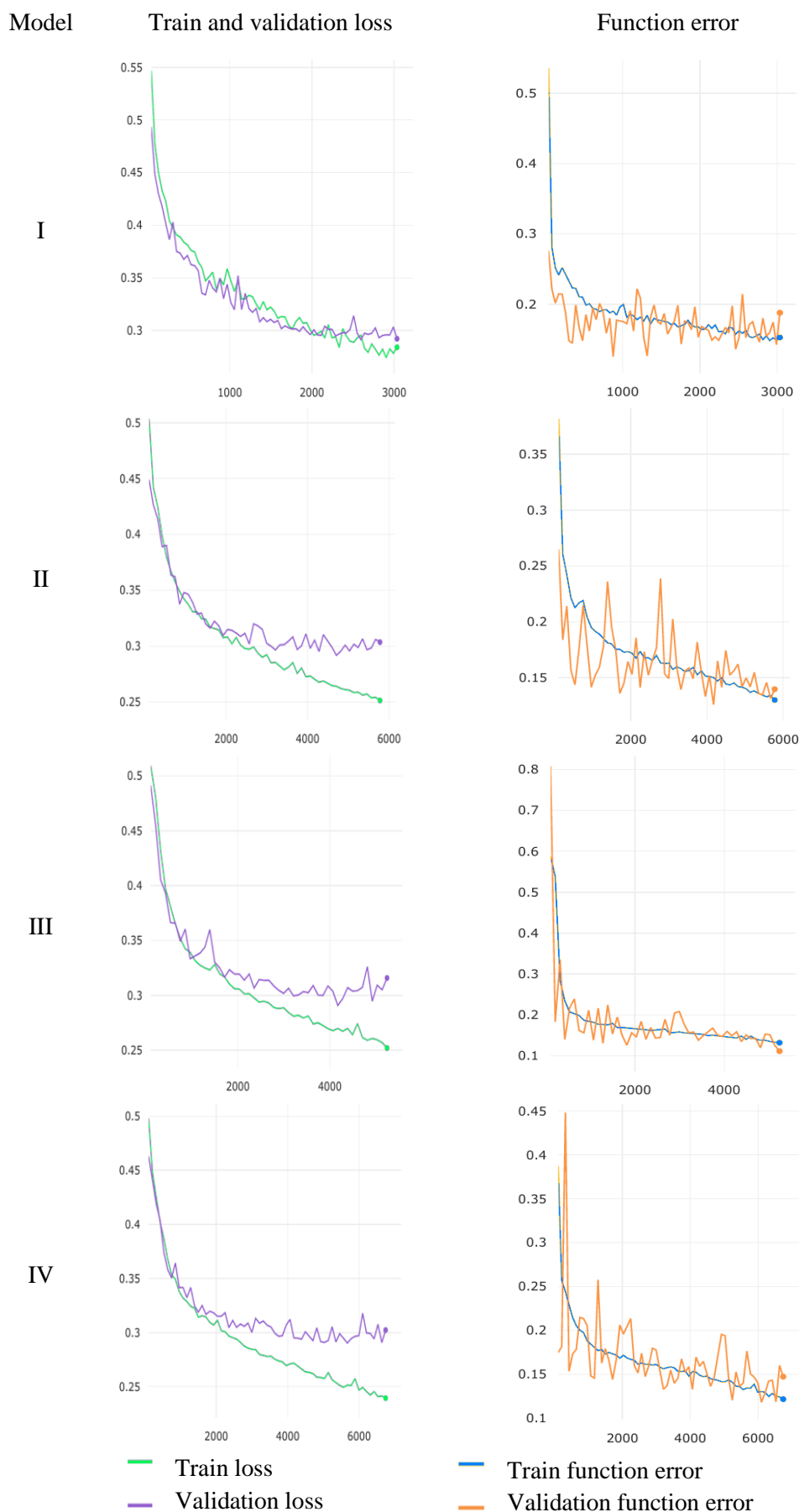


Figure 3. The graphs of the training and validation loss for Model I, II, III and IV



Table 3

Accuracy results for the models that were trained using layouts 2-10 and 5-12

Model no	Batch size	Training data #	Val/Test data #	Epoch	Time (min)	Precision	Recall	F-score
I	12	130	16/16	43	37	0.2486	0.7638	0.3751
II	6	130	16/16	53	58	0.2391	0.8390	0.3721
III	6	130	16/16	48	69	0.2455	0.8222	0.3781
IV	6	130	16/16	62	63	0.1996	0.8779	0.3253

The model IV, which was determined as the most successful model as a result of the comparison, was retrained by using the whole data set and the values in Figure 4 and Table 4 were obtained. Since the land use diversity in the data set is higher in the whole data set, a slight decrease was observed in the recall value compared to the previous experiment.



Figure 4. The graphs of the training and validation loss for Model IV based on the whole data

Table 4

Accuracy results for the models that were trained using the whole layouts

Model no	Batch size	Training data #	Val/Test data #	Epoch	Time (hr)	Precision	Recall	F-score
IV	6	3120	384/384	50	10	0.2724	0.8535	0.4130

HED based networks produce side outputs from 800x800 pixel size patches and aggregate these side outputs to create the final boundary map. Sample five side outputs created by the retrained Model IV are shown in Figure 5. It is seen that different levels of detail in the image are represented in the side outputs. The final boundary map created by the combination of these five side outputs, the ground truth and the original input image is shown in Figure 6.





Figure 5. Side outputs extracted from Model IV

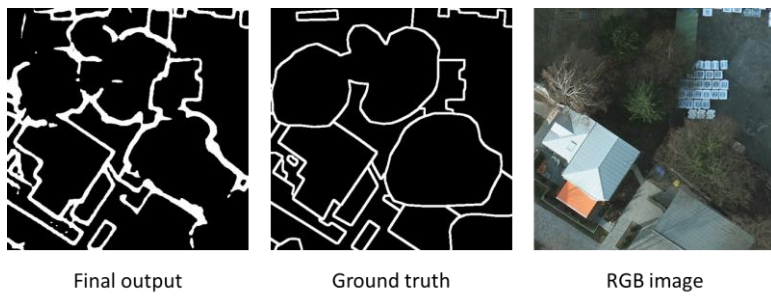


Figure 6. The final boundary map, ground truth and RGB image

Boundary maps were estimated from 800x800 patches from the test layouts with Model IV. All patches included in a layout are combined and a 6000x6000 boundary map is created for that layout. Figure 7 shows the estimated boundary map, ground truth and RGB images of the five layouts.

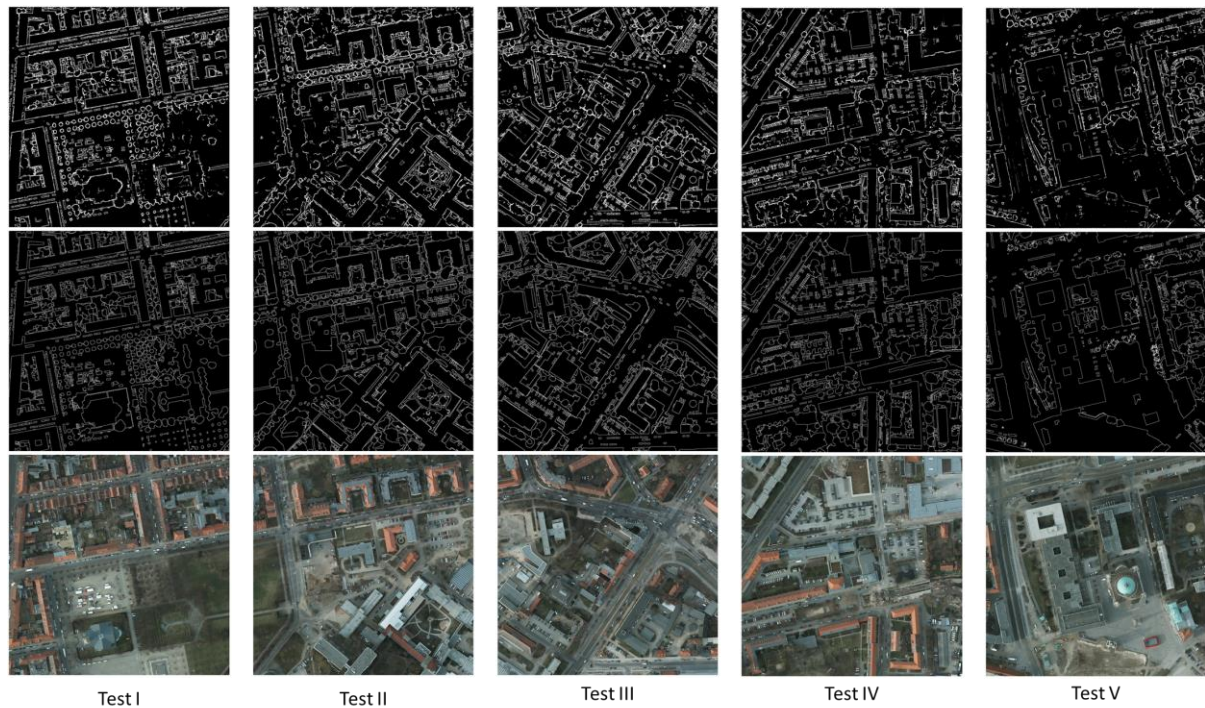


Figure 7. First row: Estimated boundaries; Second row: ground truths; Third row: RGB orthophotos.

## 5. Conclusions

In this study, automatic border extraction, which is an important problem in remote sensing, is discussed and models have been created and trained to eliminate the deficiencies in this subject. When the results obtained from two-stream and multi-data models are evaluated, an increase in the boundary extraction performance has been achieved. This situation revealed that, except from RGB, multispectral bands, height information and vegetation information must be used as input data in boundary extraction. It has been observed that three-layer data is more advantageous than one or two layers in the second stream, since it allows transfer learning. This situation shows that training three data in each stream is an option that should be considered in future studies. On the other hand, it is important to find a balance between batch size and input size in order to use the GPU memory optimally. In the future, this problem is likely to disappear due to the improvement in graphics cards. Another problem encountered was in obtaining ground truth data. It takes a lot of time to prepare a data set that presents the boundary data accurately. For this reason, boundary extraction is prepared from semantic data with handmade methods. Both the inadequacy of the handmade methods and the border uncertainties on the images make ground truth data suspicious. Therefore, it is natural for models trained according to these ground truth data to suffer prediction losses due to data instability.

## Acknowledgement

This research was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK), Project No: 119Y363.

## Author Contributions

Özgün Akçay: Conceived the study, designed the paper and wrote the introduction and conclusions.

Ahmet Cumhuri Kınacı: Performed data analysis and produced the statistical results and outputs.

Emin Özgür Avşar: Performed and wrote the data preparation.

Umut Aydar: Wrote the introduction.

## Conflicts of Interest

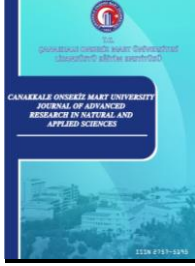
The authors declare no conflict of interest.

## References

- Alam, M., Wang, JF., Guangpei, C., Yunrong, LV. & Chen, Y. (2021). Convolutional Neural Network for the Semantic Segmentation of Remote Sensing Images. *Mobile Networks and Applications* 26(1), 200–215 Retrieved from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11036-020-01703-3>
- Altınoluk E., Akçay Ö., Kınacı A. C., Avşar Ö., Polat A. B. & Aydar U. (2020). Effects of Orthophoto Band Combinations on Semantic Segmentation. *Intercontinental Geoinformation Days (IGD)*, (pp. 9-12). Retrieved from: <http://igd.mersin.edu.tr/2020/wp-content/uploads/2020/12/final2.pdf>
- Bokhovkin, A. & Burnaev, E. (2019) Boundary loss for remote sensing imagery semantic segmentation. In: Lu, H., Tang, H., Wang, Z. (eds.) *ISNN 2019*. LNCS, 11555, 388–401. Retrieved from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-22808-8\\_38](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-22808-8_38)
- Chen, L. C., Papandreou, G., Kokkinos, I., Murphy, K., & Yuille, A. L. (2014). Semantic image segmentation with deep convolutional nets and fully connected crfs. *arXiv preprint arXiv:1412.7062*. Retrieved from: <https://arxiv.org/pdf/1606.00915.pdf>
- Chen, L. C., Barron, J. T., Papandreou, G., Murphy, K., & Yuille, A. L. (2016). Semantic image segmentation with task-specific edge detection using cnns and a discriminatively trained domain transform. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* (pp. 4545-4554). Retrieved from: <https://arxiv.org/abs/1511.03328>
- Cheng, G., & Han, J. (2016). A survey on object detection in optical remote sensing images. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 117, 11-28. Retrieved from: <https://arxiv.org/abs/1603.06201>
- Dai, J., He, K., & Sun, J. (2016). Instance-aware semantic segmentation via multi-task network cascades.

- Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition* (pp. 3150-3158). Retrieved from: <https://arxiv.org/abs/1512.04412>
- Guo, Y., Liu, Y., Georgiou, T., & Lew, M. S. (2018). A review of semantic segmentation using deep neural networks. *International Journal of Multimedia Information Retrieval*, 7(2), 87-93. Retrieved from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13735-017-0141-z.pdf>
- Han, X., Zhong, Y., & Zhang, L. (2017). An efficient and robust integrated geospatial object detection framework for high spatial resolution remote sensing imagery. *Remote Sensing*, 9(7), 666. Retrieved from: <https://www.mdpi.com/2072-4292/9/7/666>
- Hariharan, B., Arbelaez, P., Bourdev, L., Maji, S., & Malik, J. (2011). Semantic Contours from Inverse Detectors, *International Conference on Computer Vision* (pp. 991-998). IEEE. Retrieved from: <https://ttic.uchicago.edu/~smaji/papers/contours-iccv11.pdf>
- Kinzie, J., & Kuh, G. D. (2004). Going DEEP: Learning from campuses that share responsibility for student success. *About Campus*, 9(5), 2-8. Retrieved from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1002/abc.105>
- Kokkinos, I. (2015). Pushing the boundaries of boundary detection using deep learning. *arXiv preprint arXiv:1511.07386*. Retrieved from: <https://arxiv.org/abs/1511.07386>
- Kokkinos, I. (2017). Ubernet: Training a universal convolutional neural network for low-, mid-, and high-level vision using diverse datasets and limited memory. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* (pp. 6129-6138). Retrieved from: [https://openaccess.thecvf.com/content\\_cvpr\\_2017/papers/Kokkinos\\_Ubernet\\_Training\\_a\\_CVPR\\_2017\\_paper.pdf](https://openaccess.thecvf.com/content_cvpr_2017/papers/Kokkinos_Ubernet_Training_a_CVPR_2017_paper.pdf)
- Lee, C. Y., Xie, S., Gallagher, P., Zhang, Z., & Tu, Z. (2015, February). Deeply-supervised nets. In *Artificial Intelligence and Statistics* (pp. 562-570). PMLR. Retrieved from: <http://proceedings.mlr.press/v38/lee15a.pdf>
- Maninis, K. K., Pont-Tuset, J., Arbeláez, P., & Van Gool, L. (2017). Convolutional oriented boundaries: From image segmentation to high-level tasks. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 40(4), 819-833. Retrieved from: [https://www.eureyecase.eu/publications/papers/2017\\_PAMI\\_ETHZ.pdf](https://www.eureyecase.eu/publications/papers/2017_PAMI_ETHZ.pdf)
- Marmanis, D., Schindler, K., Wegner, J. D., Galliani, S., Datcu, M., & Stilla, U. (2018). Classification with an edge: Improving semantic image segmentation with boundary detection. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 135, 158-172. Retrieved from: <https://arxiv.org/abs/1612.01337>
- Rottensteiner, F., Sohn, G., Jung, J., Gerke, M., Baillard, C., Benitez, S., & Breitkopf, U. (2012). The ISPRS benchmark on urban object classification and 3D building reconstruction. *ISPRS Annals of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences I-3 (2012), Nr. 1, 1(1)*, 293-298. Retrieved from: <https://www.ipi.uni-hannover.de/fileadmin/ipi/publications/isprsannals-I-3-293-2012.pdf>
- Shen, W., Wang, X., Wang, Y., Bai, X., & Zhang, Z. (2015). Deepcontour: A deep convolutional feature learned by positive-sharing loss for contour detection. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* (pp. 3982-3991). Retrieved from: [https://openaccess.thecvf.com/content\\_cvpr\\_2015/html/Shen\\_DeepContour\\_A\\_Deep\\_2015\\_CVPR\\_paper.html](https://openaccess.thecvf.com/content_cvpr_2015/html/Shen_DeepContour_A_Deep_2015_CVPR_paper.html)
- Shorten, C., & Khoshgoftaar, T. M. (2019). A survey on image data augmentation for deep learning. *Journal of Big Data*, 6(1), 1-48. Retrieved from: <https://journalofbigdata.springeropen.com/articles/10.1186/s40537-019-0197-0>
- Xie, S., & Tu, Z. (2015). Holistically-nested edge detection. *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision* (pp. 1395-1403). Retrieved from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/7410521>
- Yu, Z., Feng, C., Liu, M. Y., & Ramalingam, S. (2017). Casenet: Deep category-aware semantic edge detection. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* (pp. 5964-5973). Retrieved from: <https://arxiv.org/abs/1705.09759>
- Yuan, X., Shi, J. & Gu, L. (2021). A review of deep learning methods for semantic segmentation of remote sensing imagery, *Expert Systems with Applications*, 169, 114417. Retrieved from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0957417420310836>





## Comparative Retrotransposon Analysis in Wheat

Seray Altıntaş<sup>1</sup>, Bekir Ahmet Ilgar<sup>1</sup>, Elif Karlık<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Art and Science, İstinye University, İstanbul, Turkey

### Article History

Received: 03.07.2021

Accepted: 30.08.2021

Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** – The presence of retrotransposons is associated with polyploidy, especially in wheat, and may cause an increase in genome size. In this study, the evolutionary information was aimed to reveal based on the comparison retrotransposon movements between bread and einkorn wheat. For that reason, the transposition of *BARE1*, *Sukkula* and *Nikita* retrotransposons in bread and einkorn wheat were analysed by using IRAP-PCR molecular marker method. Both monomorphic and polymorphic bands in each wheat species have been demonstrated. IRAP-PCR products of *Sukkula* retrotransposon was showed as 10 bands in bread wheat, but no bands could be determined in einkorn wheat. *Nikita* retrotransposon was demonstrated as 6 bands in bread wheat, 14 bands in einkorn wheat. Polymorphism rate was calculated as 81% for *Nikita* between bread wheat and einkorn wheat. However, the presence of *BARE1* were not observed in both species. The obtained findings suggest that *Nikita* retrotransposon contributes to genome obesity, especially in bread wheat. The failure of *Sukkula* retrotransposon detection in einkorn wheat indicates that *Sukkula* may be inserted in the genome of bread wheat by horizontal gene transfer during wheat domestication events. These results may contribute understand the organization of wheat genome during domestication.

**Keywords** – *BARE1*, Bread Wheat, Einkorn Wheat, *Nikita*, *Sukkula*.

### 1. Introduction

Wheat, especially durum and bread wheat, is a one of the main foods used as human nutrition in the world-wide. Wheat genome evolution has been under the impact of hybridization and polyploidization events. Wheat varieties consist of 13 diploid and 18 allopolyploid species. Archaeological evidence points out einkorn wheat (*Triticum monococcum*), which is diploid, have been domesticated in the Karacadağ mountains of Turkey, during the Pre-Pottery Neolithic period (Heun et al., 1997). However, bread wheat (*Triticum aestivum*), which was rooted in two main domestication events, is an allohexaploid (AABBDD). First domestication event was resulted with allotetraploid (AABB) durum wheat is rooted in the part of Fertile Crescent region in Turkey on 2.5–4.5 MYA. The second domestication event is allohexaploidization of bread wheat (Dubcovsky & Dvorak, 2007).

In plants, repetitive DNA is mostly derived from the proliferation of retrotransposons play significant roles in the evolution of almost all organisms. Most of the retrotransposons are inactive in the genome under normal condition, although they can be induced by some environmental conditions such as biotic and abiotic stresses (Arvas et al., 2021). Especially in wheat, polyploidy has been associated with the presence of retrotransposons that they can cause an increase in genome size (Hartley & O’neill, 2019). *BARE1* is the most common and

<sup>1</sup> seray.altintas@stu.istinye.edu.tr

<sup>2</sup> bekir.ilgar@istinye.edu.tr

<sup>3</sup> elif.karlik@istinye.edu.tr

\*Corresponding Author

active Long Terminal Repeat (LTR)-retrotransposon, especially in somatic tissues ([Marakli, Yilmaz & Gozu-kirmizi, 2012](#)). Another barley retrotransposon is *Nikita* has been widely used in different studies such as genetic diversity and determination of polymorphism patterns in polyploids ([Bayram et al., 2012](#)). Moreover, sequence analysis indicated *Sukkula* sequences are mostly conserved in barley. In plants, active retrotransposons play important roles for genome diversification due to transposition and accumulation potentials. Especially, barley-specific retrotransposons have been studied and their transferability exhibited that these retrotransposons provide valuable information about species diversification during the evolutionary time ([Marakli et al., 2019](#)).

Well-studied barley retrotransposons, including *BARE1*, *Nikita* and *Sukkula* were aimed to identify in bread and einkorn wheat in this study. For this purpose, the presence of *BARE1*, *Nikita* and *Sukkula* was investigated by using IRAP-PCR technique and results were analysed by Dice similarity coefficient. This is the first report to demonstrate *Sukkula* and *Nikita* insertions in wheat genome and is expected to provide insight into the effects on genomic variations.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Growth Conditions

*T. aestivum* and *T. monococcum* plant seeds were provided from Directorate of Trakya Agricultural Research Institute in Turkey. Surface sterilization of wheat seeds performed with 70% ethanol at 2 minutes, 0.1% HgCl<sub>2</sub> at 20 minutes, rinsed with dH<sub>2</sub>O at 10 minutes, 20% commercial bleach at 15 minutes (with 3 drops of TWEEN® 20) (Unilever Industry and Trade Turkish Joint Stock Company, Istanbul; Sigma, P1379, Merck SA, Argentina) and then seeds were washed with sterile distilled water for three times. Afterward, seeds were placed as 7 seeds in each petri dish containing MS medium (Caisson, Smithfield, USA). Both wheat seeds were germinated for ten days at 25 ±2°C, 16h light/8h dark period under controlled conditions in a growth chamber (Miprolab MK500, Ankara). HgCl<sub>2</sub> and TWEEN® 20 were not used in surface sterilization of bread wheat, rest of protocol performed as same.

### 2.2. Genomic DNA Extraction

Six seeds were randomly selected among both bread wheat and einkorn wheat. Genomic DNA extraction was performed the manufacturer's protocol by using the HiPurA® Plant Genomic DNA Miniprep Purification Kit (Himedia, Einhausen, Germany). DNA concentration was evaluated by UV spectrophotometry (Thermo Scientific, AZH1705428). DNA integrity was observed on agarose gel (1%) electrophoresis.

### 2.3. IRAP-PCR

Four of *T. aestivum* plants' DNAs were mixed and six of *T. monococcum* plant's DNA were mixed and used as template of IRAP-PCR method (Biorad, Dubai). Primers of *Sukkula*, *Nikita*, and *BARE1* retrotransposon used in IRAP-PCR showed at [Table 1](#). IRAP-PCR was performed with Ex Taq™ DNA Polymerase Perfect Mix (Takara, RR039B, Saint Germain en Laye, France).

Table 1  
Primer sequences used in IRAP-PCR.

Primer	Sequences	Reference
<i>Sukkula</i>	5'GTCGGGCTACGGCTGCAAGG 3'	<a href="#">Leigh et al., 2003</a>
<i>Nikita</i>	5'CGCATTGTGTTCAAGCCTAAACC 3'	<a href="#">Rodriguez et al., 2006</a>
<i>BARE1</i>	5'ATCATTCCCTCTAGGGCATAATTC 3'	<a href="#">Schulman et al., 2004</a>

IRAP-PCR was carried out under the following order: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, 55 and 61 °C used as annealing temperature for 30 sec for *Nikita* and *Sukkula*, respectively, and 72°C for 3 min. Final extension was at 72°C for 10 min. For *BARE1* primer, gradient PCR was conducted at annealing temperatures 59-65°C. Obtained products were evaluated by using 2% agarose gel.

## 2.4. Polymorphism Analysis

The Dice Similarity Coefficient was used the evaluation of the polymorphism rates of samples ([Dice, 1945; Nei & Li, 1979](#)). Also, the GelJ v.2.0 program was used to cluster the samples ([Heras et al., 2015](#)).

## 3. Results and Discussion

Wheat is a dominant food is consumed in may diets by billions of people. Two main varieties dominate the current global wheat production; one is the durum wheat and bread wheat the other. Nowadays, einkorn wheat is mostly used for improving to pesticide and disease resistance, biotic and abiotic stress tolerance. Additionally, the improvement of agriculturally significant crops has accelerated by genomic studies. However, studying with wheat (*Triticum* spp.) is challenging due to its large size and the genome complexity ([Appels et al., 2018](#)). We conducted retrotransposon analysis in bread wheat and einkorn wheat to understand the wheat genome evolution and domestication footsteps. In this study, most abundant retrotransposons – *Sukkula*, *Nikita* and *BARE1*– in barley were selected and their transposition events were investigated by using IRAP-PCR. According to our results, *Sukkula* and *Nikita* presence were demonstrated in wheat at first time. However, we do not able to show *BARE1* existence in both wheat varieties.

According to the electrophoresis results, 10 bands were detected in *T. aestivum*, ranging from 200 to 1,500 bp for *Sukkula* ([Figure 1a](#)), but band patterns were not observed in *T. monococcum*. Analysis of *Nikita* band profiles totally showed 30 bands: 6 monomorphic and 9 polymorphic bands ranging from 500 to 3,500 bp ([Figure 1b](#)). For *Nikita*, polymorphism rates were calculated as 0–81% in between bread and einkorn wheat ([Figure 1c](#)). Also, the phylogenetic tree of *Nikita* was clustered for bread wheat and einkorn wheat shown in [Figure 1d](#).

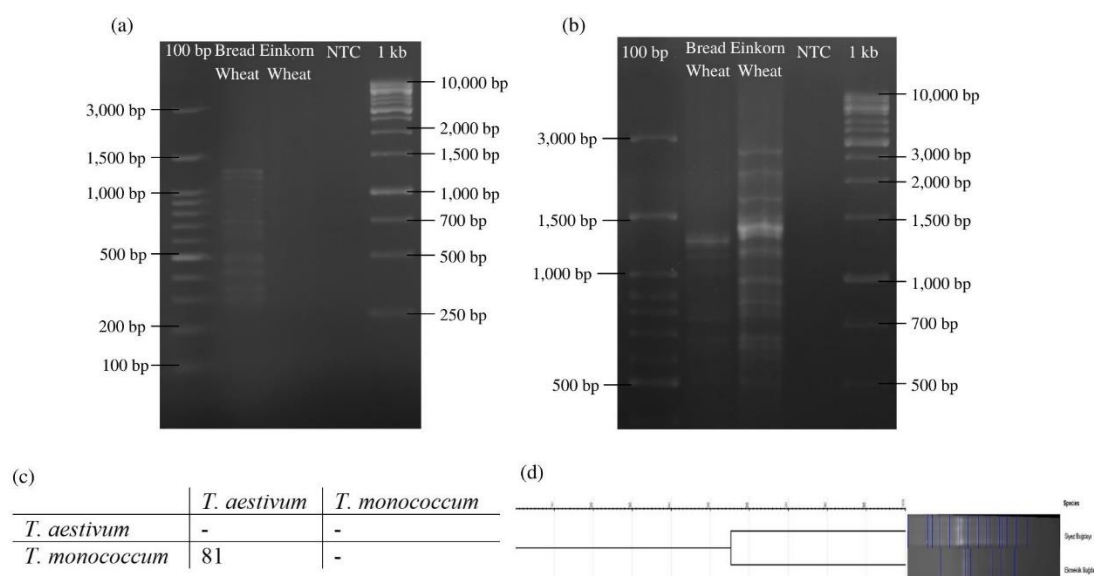


Figure 1: Result of IRAP-PCR analysis. (a) IRAP-PCR products of *Sukkula* on 2% agarose gel, (b) IRAP-PCR products of *Nikita* on 2% agarose gel, (c) polymorphism rates of *Nikita* in two wheat species, (d) clustering of wheats based on the results of *Nikita* IRAP-PCR. NTC: no template control.



Retrotransposon amplification events are the main reason of ‘genome obesity’ in plants and shape the genome structure. Retrotransposon accumulation and polyploidization are not entirely independent events, however, both two mechanisms affect one another has also been great influence for crop breeding and domestication. The wheat genome has also undergone massive amplification and accumulation of transposons. Interestingly, transposon content was found to be very similar between sub-genomes of bread wheat. Moreover, transposon analysis demonstrated no evidence for explosion of transposon amplification in bread wheat genome after polyploidization events ([Wicker et al., 2018](#)). On the other hand, our findings suggest that *Nikita* contributed the genome obesity in bread wheat. *Nikita* has been reported as the fourth most active retrotransposon in barley, while *BARE1* was found the most active retrotransposon ([Leigh et al., 2003](#)). Active retrotransposons are mostly useful to study plant diversification due to their transpositions and accumulation potentials in the genome. Many reports exhibited polymorphism among species through retrotransposon movements according to their activities in the genome ([Marakli, 2019](#)).

Therefore, we selected *Nikita* to evaluate polymorphism rates in both wheat varieties. According to our results, *Nikita* was demonstrated in both bread wheat and einkorn wheat, indicating that *Nikita* is present and active in wheat genome. Moreover, polymorphism percentage was found as 81% in our study, suggesting that two wheat varieties had different pathways during the long evolutionary time. Retrotransposon transpositions and amplification can be activated by stress conditions, reduced DNA methylation, or after genome rearrangements which can lead the escape from host silencing mechanisms ([Ito & Kakutani, 2014](#)).

*Sukkula* was first identified in barley genome at Mlo locus. Interestingly, *Sukkula* means “shuttle” in Finnish because of these elements are non-autonomous belonging to large retro-transposon derivatives or LARDs ([Shirasu et al., 2000](#)). Additionally, some studies also indicated the presences in different genomic regions based on selection and “host control” pressures in a very long evolutionary time ([Rebollo, Romanish & Mager, 2012](#)). In our study, we demonstrated the *Sukkula* existence only in bread wheat, not in einkorn wheat. These findings suggested that *Sukkula* elements insertions may be occurred during the domestication of wheat. As it is known, domestication is a key event together with allopolyploidization to shape the wheat genome ([Avni et al., 2017](#)). However, further genome analysis is needed to determine in which domestication time *Sukkula* has inserted the wheat genome. Additionally, both barley and wheat have emerged the same regions at Fertile Crescent. Both these two species have evaluated in close regions may lead up to the horizontal gene transfers.

In some cases, insertion and amplification potentials of a transposon families are shared by related species. Interestingly, a transposon family in one species can be observed with a high copy number, while some transposon families in close relatives can be present with a low copy number ([Estep, DeBarry & Bennetzen, 2013](#)). Studies suggest that *BARE1* in barley is the most active retrotransposon ([Marakli, Yilmaz & Gozukirmizi, 2012](#)). However, we did not able to detect *BARE1* transposition events in both bread wheat and einkorn wheat. One of the main reasons why *BARE1* cannot be detected can be the absence of *BARE1* in wheat genome. Also, another reason can be the lack of recognition sites of primer due to the deterioration of the LTR sequences. Further analysis is required to reveal main reason why *BARE1* primer did not study in wheat genome.

#### 4. Conclusion

Whole-genome sequences analysis in plants highlight the major roles of retrotransposon in evolution of wild and domesticated plant species such as einkorn wheat and bread wheat. The existence of barley retrotransposons -*Nikita* and *Sukkula*- was observed in the wheat genome at first time, although the presence of *BARE1* could not be detected in this study. Such information will contribute to reveal the effects of the retrotransposons on wheat genome organization during the domestication events.

## Acknowledgement

This work was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (project number 1919B01190223).

## Author Contributions

Elif Karlik: Conceived and designed the analysis.

Bekir Ahmet Ilgar: Collected data and performed the analysis.

Seray Altintas: Collected data and wrote the paper.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., ... & Khurana, J. P. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361(6403). DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
- Arvas, Y. E., Abed, M. M., Zaki, Q. A., Kocaçalışkan, İ., & Haji, E. K. (2021, May). The Potential Role of Transposable Elements as Molecular Markers. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 761, No. 1, p. 012031). IOP Publishing. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/761/1/012031>
- Avni, R., Nave, M., Barad, O., Baruch, K., Twardziok, S. O., Gundlach, H., ... & Distelfeld, A. (2017). Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science*, 357(6346), 93-97. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aan0032>
- Bayram, E., Yilmaz, S., Hamat-Mecbur, H., Kartal-Alacam, G., & Gozukirmizi, N. (2012). 'Nikita' retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Omics*, 5(3), 211-215.
- Dice, L. (1945). Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology*, 26(3), 297-302. Retrieved From: <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.388058501628283>
- Dubcovsky, J., & Dvorak, J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316(5833), 1862-1866. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1143986>
- Estep, M. C., DeBarry, J. D., & Bennetzen, J. L. (2013). The dynamics of LTR retrotransposon accumulation across 25 million years of panicoid grass evolution. *Heredity*, 110(2), 194-204. DOI: <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.99>
- Hartley, G., & O'Neill, R. J. (2019). Centromere repeats: hidden gems of the genome. *Genes*, 10(3), 223. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10030223>
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC bioinformatics*, 16(1), 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Heun, M., Schäfer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., & Salamini, F. (1997). Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278(5341), 1312-1314. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1312>
- Ito, H., & Kakutani, T. (2014). Control of transposable elements in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research*, 22(2), 217-223. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9417-9>
- Kalendar, R., Vicent, C. M., Peleg, O., Anamthawat-Jonsson, K., Bolshoy, A., & Schulman, A. H. (2004). Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. *Genetics*, 166(3), 1437-1450. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.166.3.1437>
- Leigh, F., Kalendar, R., Lea, V., Lee, D., Donini, P., & Schulman, A. H. (2003). Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(4), 464-474. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0850-2>
- Marakli, S., Yilmaz, S., & Gozukirmizi, N. (2012). BARE1 and BAGY2 retrotransposon movements and expression analyses in developing barley seedlings. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(6), 3451-3456. DOI: <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0112>

- Marakli, S., Calis, A., & Gozukirmizi, N. (2019). Determination of barley-specific retrotransposons' movements in *Pinus nigra* ssp. *pallasiana* varieties: pyramidata and Seneriana. Russian Journal of Genetics, 55(1), 71-78. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795419010101>
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(10), 5269-5273. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Rebollo, R., Romanish, M. T., & Mager, D. L. (2012). Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. Annual review of genetics, 46, 21-42. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155621>
- Rodriguez, M., O'Sullivan, D., Donini, P., Papa, R., Chiapparino, E., Leigh, F., & Attene, G. (2006). Integration of retrotransposons-based markers in a linkage map of barley. Molecular Breeding, 17(2), 173-184. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-005-4885-4>
- Schulman, A. H., Flavell, A. J., & Ellis, T. N. (2004). The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. In Mobile genetic elements (pp. 145-173). Humana Press. Retrieved From: <https://link.springer.com/protocol/10.1385%2F1-59259-755-6%3A145>
- Shirasu, K., Schulman, A. H., Lahaye, T., & Schulze-Lefert, P. (2000). A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. Genome Research, 10(7), 908-915. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.10.7.908>
- Wicker, T., Gundlach, H., Spannagl, M., Uauy, C., Borrill, P., Ramírez-González, R. H., ... & Choulet, F. (2018). Impact of transposable elements on genome structure and evolution in bread wheat. Genome biology, 19(1), 1-18. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1479-0>



# Morphometric and Morphotectonic Characteristics of Sürgü and Çardak Faults (East Anatolian Fault Zone)

Musa Balkaya<sup>1,\*</sup>, Süha Özden<sup>2</sup>, H. Serdar Akyüz<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Geology Engineering, School of Graduate Studies, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup> Department of Geology Engineering, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>3</sup> Department of Geological Engineering, Faculty of Mines, İstanbul Technical University, İstanbul, Turkey

## Article History

Received: 20.05.2021

Accepted: 02.08.2021

Published: 20.09.2021

## Research Article

**Abstract-** Within the framework of this study, morphotectonic and structural characteristics of the Sürgü and Çardak faults, the northern branch of the East Anatolian Fault Zone (EAFZ) between Çelikhan and Göksun, were investigated with scrutiny. Further, the results obtained with morphotectonic assessments supported and fortified with a thorough literature review and field studies; thereby, geological features of the region have been analyzed immaculately. The Sürgü and Çardak faults were mapped with special attention to the lithological, structural, and geomorphological features of the study area. Investigations along the Holocene river valleys along the approximately E–W trending Sürgü and Çardak faults evidently indicate that these faults represent sinistral active fault morphology. In terms of morphometric assessments, mountain front sinuosity (Smf), the Valley Floor Width-to-Valley Height ratio (Vf) and Stream Length-Gradient Index (SL) were employed along the mountain-piedmont junction and on the drainage network. Recorded Smf values range from 1.21 to 1.48, and average Vf rates are between 0.20 and 1.12, which typically indicate high tectonic activity for the Sürgü and Çardak faults. SL indice exercised along the 10 valleys in the study area, the recorded values vary between 5.8 and 1330.0; besides, the higher anomalies are recorded adjacent to the Sürgü and Çardak faults. Implemented morphotectonic investigations and evaluations indicate that the Sürgü and Çardak faults play a key role in the morphotectonic evolution of the region.

**Keywords** – Active tectonic, East Anatolian Fault Zone, morphometric indices, morphotectonic, Sürgü and Çardak faults

## 1. Introduction

Earthquakes are one of the most destructive natural disasters that have certain consequences on mankind's life, economy, and social communities. Densely populated civic settlements dominated with active faults are prone to destructive earthquakes; hence, people living in nearby regions should exercise preparations in advance against earthquakes. Within the boundaries of the study area, there exist active deformation zones with high earthquake potential such as the Southeastern Anatolia Thrust Belt and the East Anatolian Fault Zone (EAFZ), which are generated as a result of the collision between the African-Arabian and Eurasian plates in the north-south orientation. Immaculate examination of the morphotectonic properties of the aforementioned zones can facilitate our understanding of the characteristic features of these faults.

Performed investigations up to the contemporary era, show that the manifold activities along the faults generate different geomorphologic features on the earth's crust (Keller and Pinter, 2002). Morphometric discipline is one of the most popular and effective measures to interpret and evaluate the connotations of these features. There exist many geological, geomorphological, and tectonic studies on the northern branch of the EAFZ between Çelikhan and Göksun (Perinçek and Kozlu, 1984; Yılmaz, 2002; Westaway, 2004; Koç, 2005; Sunkar, Günek, & Canpolat, 2008; Duman and Emre, 2013; Koç and Kaymakçı, 2013; Emre et al., 2016). Nonetheless,

<sup>1</sup> musabalkaya@ksu.edu.tr

<sup>2</sup> ozden@comu.edu.tr

<sup>3</sup> akyuz@itu.edu.tr

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author



morphotectonic investigations remained unprecedented in this area. Hence, within the architecture of this original research article morphotectonic characteristics of the 160-km-long deformation zone including the Sürgü and Çardak fault segments have been discovered and analyzed (Figure 1).

The Sürgü and Çardak faults have been analyzed rigorously in order to form a basis for morphotectonic studies. The Sürgü and Çardak faults runs through numerous settlements such as Çelikhan, Kurucaova, Sürgü, Nurhak, Barış, Ekinözü, Ericek, Çardak, Gücüku, and Göksun. Thus, discovering and revealing the earthquake hazard potential of the Sürgü and Çardak faults is of utmost importance in terms of human life, industrial, and urban planning and engineering studies.

The foremost goal of this study is to examine and analyze the Sürgü and Çardak fault segments with morphotectonic discipline. Consequently, morphotectonic assessments exercised for this purpose. Acquired data represent valuable information about the Late Quaternary activity of the Sürgü and Çardak faults and the impacts of these faults on the morphologic and topographic evolution of this domain. In addition, mountain-piedmont junctions, valleys, and drainage networks associated with the Sürgü and Çardak faults evaluated with quantitative morphometric indice methods, which cater good insight about the tectonic activity of these faults.

In what follows, with pursuing a general to specific mean, first, the EAFZ is explained, and then the Sürgü and Çardak faults, which are a part of the northern branch of the EAFZ, are discussed in detail. Finally, compiled information about the Geology around the Sürgü and Çardak faults is presented.

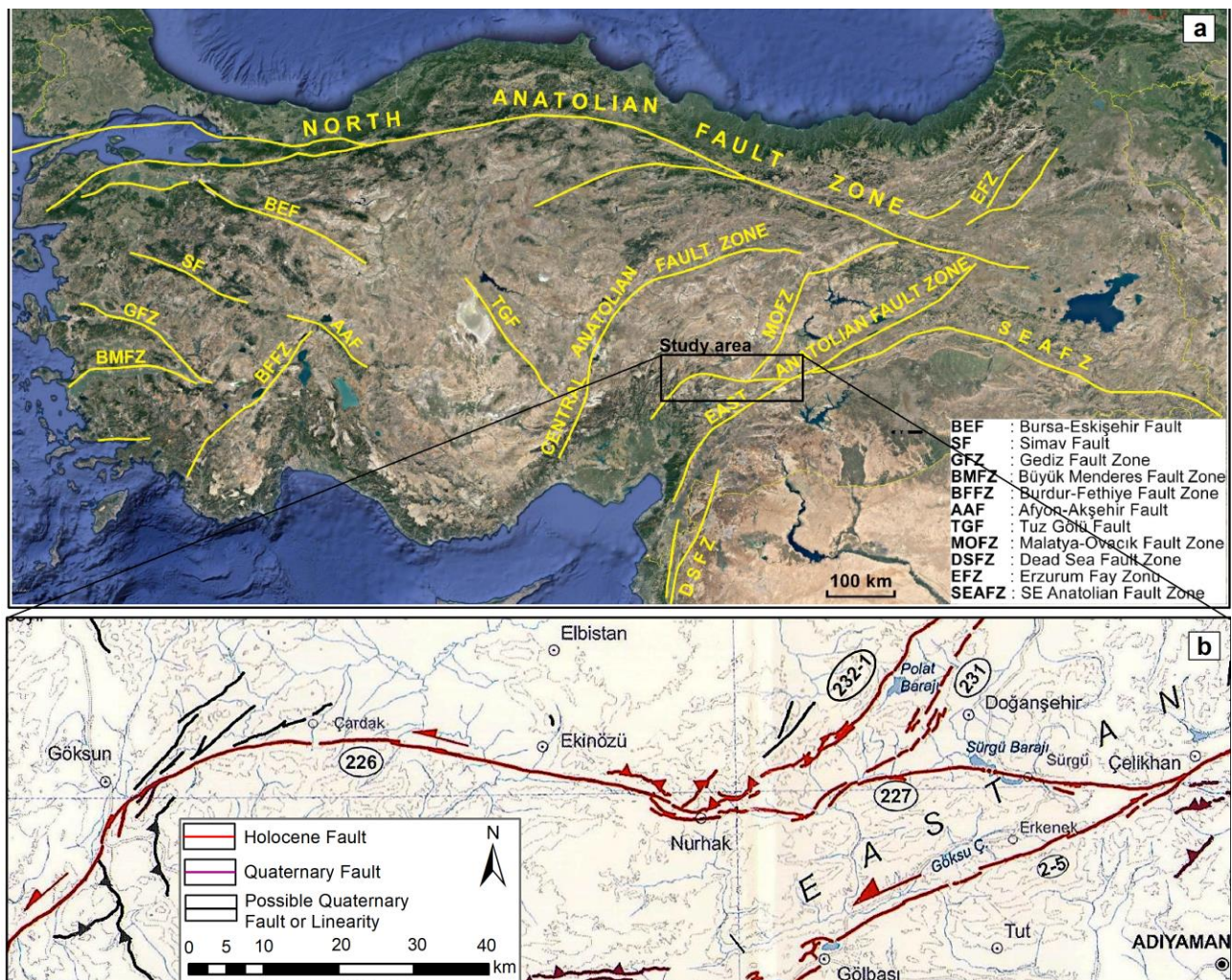


Figure 1. (a) Location of the study area on the active fault maps of Turkey (simplified from [Emre et al \(2013\)](#)). (b) Orientation of active faults in the study area ([Emre et al., 2013](#); 226: Çardak fault, 227: Sürgü fault, 231: Doğanşehir fault, 232-1: Malatya Fault-Akçadağ segment).

### 1.1. The East Anatolian Fault Zone

The EAFZ is one of the most important and highly active faults of Turkey; thereby, many geological, geomorphological, tectonic, and paleoseismological studies have been carried out along the fault zone. The East Anatolian Fault Zone prolongs for approximately 580 km length with a dominant sinistral sense of motion (Şaroğlu, Emre, & Kuşçu, 1992). The general geometry of the fault zone predominantly shaped by a series of active faults which are positioned with parallel, subparallel, and oblique orientations (Şengör, 1980; Nalbant, McCloskey, Steacy, & Barka, 2002; Özdemir and İnceöz, 2003; Herece, 2008; Kop et al., 2014; Emre et al., 2016). The EAFZ starts from Karlıova in the northeast, runs through the Kahramanmaraş and ultimately ends around the Dead Sea Fault. The EAFZ indicate a single strand strike-slip fault geometry until the west of Çelikhhan, from this point onwards, nevertheless, it is switched into several bifurcations where deformation accommodates within a wide zone (Duman and Emre, 2013). The main branch of the EAFZ between Karlıova and Antakya was split into 7 segments by Emre et al. (2016). These are namely: Karlıova, Ilıca, Palu, Pötürge, Erkenek, Pazarcık and Amanos segments (Figure 2).

From Çelikhhan to Iskenderun Bay, the northern branch of the Eastern Anatolian Fault Zone prolongs for about 380 km and represents characteristic features of an active left-lateral strike-slip fault along its orientation. From Northeast to Southwest, this fault zone is divided into 9 segments: Sürgü, Çardak, Savrun, Çokak, Yakapınar, Andırın, Toprakkale, Yumurtalık and Karataş segments (Duman and Emre, 2013; Emre et al., 2016).

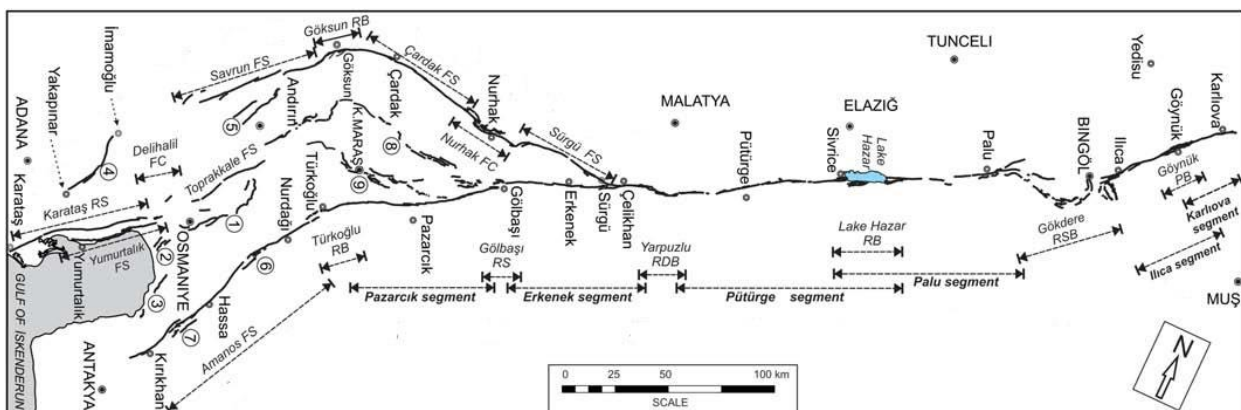


Figure 2. The figure shows the general geometry of the Eastern Anatolian Fault System (the main branch, northern branch and associated fault segments; Duman and Emre, 2013). Abbreviations: FS, fault segment; RB, releasing bend; RS, releasing stepover; RDB, restraining double bend; RSB, restraining bend; PB, paired bend; (1) Düziçi-Osmaniye fault segment; (2) Erzin fault segment; (3) Payas fault segment; (4) Yakapınar fault segment; (5) Çokak fault segment; (6) İslahiye releasing bend; (7) Demrek restraining stepover; (8) Engizek fault zone; (9) Maraş fault zone.

Although theories regarding the onset of deformation along the EAFZ is controversial, there is a consensus on the Late Pliocene age among researchers (Şaroğlu et al., 1992; Westaway, 2004; Yönlü, Altunel, Karabacak, & Akyüz, 2013). Geodetic data indicate approximately 10 mm/y slip rate throughout the fault zone, yet geological investigations demonstrate that the slip rates vary between 4-11 mm/y (McClusky et al., 2000; Reilinger et al., 2006; Herece, 2008; Yönlü et al., 2013; Emre et al., 2016). Regarding the displacement and offset measurements along the EAFZ, conducted studies reported 15-27 km of sinistral displacement based on the offset of Fırat river and the displacement amount of the pre-Pliocene rocks (Yönlü et al., 2013).

### 1.2. The Northern Branch of EAFZ Between Çelikhhan and Göksun

Between Çelikhhan and Göksun, the Sürgü and Çardak faults that constitute the northern branch of the EAFZ are the subject of this study (Figure 1). Many studies on this area, defined the Sürgü and Çardak faults as a left lateral strike-slip faults (Perinçek and Kozlu, 1984; Yılmaz, 2002; Westaway, 2004; Duman and Emre, 2013; Emre et al., 2016). A number of other studies, on the other hand, based on remote sensing methods, field



observations and fault slip data acclaimed that the Sürgü Fault Zone, which consists of Sürgü and Çardak fault segments, are representing dextral strike-slip kinematic characteristics (Koç, 2005; Sunkar et al., 2008; Koç & Kaymakçı, 2013). Furthermore, Duman and Emre (2013) based on the recorded systematic offsets along the Holocene drainage networks, stated that there exist 3mm/y and 2.5 mm/y of slip throughout the Sürgü and Çardak faults respectively.

### 1.2.1. The Sürgü Fault

The Sürgü fault differentiates from the EAFZ around the west of Çelikhan and runs through the west of Nurhak, enclosing the Nurhak fault complex. The E-W trending Sürgü fault extends approximately for 75 km and represents active left-lateral strike-slip fault geometry (Perinçek and Kozlu, 1984; Yılmaz, 2002; Westaway, 2004; Duman and Emre, 2013; Emre et al., 2016).

The research conducted by Koç (2005) and Koç and Kaymakçı (2013) on the Sürgü fault, claimed that the western part of the Sürgü fault demonstrate predominant right-lateral strike-slip motion and reverse components, while the eastern part represents prevailing right-lateral strike-slip motion with a normal component, mainly based on evaluated remote sensing methods, field observations, and fault slip data. These two studies declared that the dextral motion of the Sürgü Fault Zone could be explained by the westward escape of the Maraş Block as a result of the N-S collision of the Arabian Plate and the Anatolian Block.

Moreover, another study by Sunkar et al. (2008) contended that the Sürgü Fault Zone and EAFZ are both independent fault zones, and supported the right-lateral motion of the fault zone. Moreover, another study by Sunkar et al. (2008) contend that the Sürgü Fault Zone is an individual fault zone from EAFZ, and interweave the right-lateral motion of the fault zone to this hypothesis. In this paper, the geomorphologic properties of the Kurucaova and its surrounding regions (covering an area of 30 km<sup>2</sup>) located in the south of the Sürgü fault were investigated.

The Yılmaz (2002)'s study shows that prolonged ridges in the eastern part of the Sürgü fault; and irregular valleys interrupted by the fault at pour point section, and sinistrally offset rivers in the western parts of Sürgü fault are the main distinct morphological structures. A total of 4 km left-lateral offset was detected along the fault; therefore, even in the premier context, the fault must have developed in the Pliocene period (Yılmaz, 2002). Although the eastern extension of the Sürgü fault up to Sürgü town is dipping in the north direction, the fault segment in the west of Sürgü is dipping 850 southwards and its slope angle decreases gradually towards the depth (Taymaz, Eyidoğan, & Jackson 1991; Yılmaz, 2002).

Duman and Emre (2013) claimed that the 17-km-long and 1-km-wide zone located in the eastern part of Sürgü fault is characterized by a shutter ridge. This distinctive structure shows that the Sürgü fault is effective in shaping the morphology of the region. Then the fault continues for 20 km westward along the southern branch of the Sürgü river valley, where tributaries and intervening ridges are systematically offset. The western margin of the fault is represented by two sub-parallel faults at a 5 km distance and then meets the Nurhak fault complexity (Duman and Emre, 2013).

Duman and Emre (2013) investigations represent that a Holocene aged alluvial fan was offset by the surface rupture, indicating that the Holocene surface faulting occurred along the Sürgü fault during a large earthquake. However, the same research also states that the 1986 Sürgü earthquakes with magnitudes of 5.6 and 5.8 are not associated with a surface deformation on the Sürgü fault.

### 1.2.2. The Çardak Fault

The ~85-km-long Çardak fault represents a concave geometry between Nurhak and Göksun. In about 10 km east of Ericek (Göksun), the fault jumps towards the right direction over a nearly 500 m wide stepover, and then fault tips bifurcates into two branches toward east (35km) and west (50 km) directions. By and large, starting from the west of Nurhak district the eastern section of the fault represents a linear geometry. The

Çardak fault disrupts the creeks flowing on the wide alluvial fan deposits between Barış and Gözpinar by offsetting them from 100 to 135 meters. In the west of Ekinözü, this fault offset Ceyhan Valley 3 km to the left (Duman and Emre, 2013). In addition, Duman and Emre (2013) stated that the 50-km-long western section of the Çardak fault cuts the folds and older thrusts and exhibits an evident active left-lateral fault morphology; besides, in this part, the Holocene river valleys and bedrocks displaced and offset by the fault.

### 1.3. Geology of the Study Area

In order to map the geological formations and structural features in the study area, detailed investigations were conducted with thorough observations during field studies around the fault zone. The orientation of the fault was observed during the field study based on the current Active Fault Map of Turkey prepared by the General Directorate of Mineral Research and Exploration (MTA) in 2013 (Emre et al., 2013). During different intensive field trips, the Sürgü and Çardak faults were mapped with special attention to the lithological, structural, and geomorphological features of the study area (Figure 3).

The geological map of the 160-km-long and nearly 15-km-wide zone enclosing the E-W trending Sürgü and Çardak faults was prepared (Figure 3). During the map preparation stages, the 1/100.000 scale geological map of the Elbistan-L37 and L38, Malatya-L39 and L40, Gaziantep-M37 and M38, Şanlıurfa-M39 and M40 sections published by the MTA (2014) were utilized. Since the Sürgü and Çardak faults run through the edges of the aforementioned map sections, eight 1/100.000 scale geologic maps were combined and the basis was formed. Lithological units of the study area are divided into 3 main groups: namely pre-Miocene, Miocene, and post-Miocene units. Pre-Miocene basement rocks, which blanket a large proportion of landscape within the study area, consists of magmatic, metamorphic, and sedimentary rock types. Magmatic rock units, including basalt, diabase, spilitic basalt, agglomerate, and volcano-sedimentary rocks exposed to the east of the study area.

Metamorphic rocks, however, are prevailing throughout the whole study area, and rock samples such as marble, recrystallized limestone, schist, calcschist, mica schist, serpentine, peridotite, gabbro, metagabbro, gneiss, augen gneiss, quartzite, phyllite, and amphibolite are frequently exposed at different sections of the area. Sedimentary rocks within the pre-Miocene basement rocks spread throughout the study area. Moreover, sedimentary rock units like limestone, conglomerate, sandstone, mudstone, neritic limestone, dolomite, siltstone, claystone, and shale are also observed sporadically in the study area (Bedi and Yusufoglu, 2018; Çoban and Dalkılıç, 2018; Usta et al., 2018).

In the study area, the Miocene units disseminate at the south of the Çardak fault; moreover, they are enumerated as lower Miocene sandstone-mudstone-limestone unit, Middle Miocene sandstone-mudstone-limestone unit, Upper Miocene claystone-sandstone unit, and Upper Miocene-Pliocene sandstone-mudstone-limestone units (Baydar and Yergök 1996; Usta et al., 2018).

Pliocene-Quaternary units in the study area are Pliocene conglomerate-sandstone-mudstone unit observed in the north of Sürgü dam, Pliocene sandstone-mudstone-limestone unit detected in NW of Ekinözü district located around the north of the Çardak fault, Plio-Quaternary conglomerate-sandstone-mudstone unit observed around Kurucaova to the south of the Sürgü fault and the Pliocene-Pleistocene alluviums seen in the north of the western edge of the Sürgü fault (Tatlar; Usta et al., 2018).

Within the study area, the faults cut and run throughout valleys and basins where Quaternary units lie across them. These units can be enumerable as alluvium, debris flows, young and old alluvial fan deposits. The alluvium deposits exposed along the valleys and faults throughout the study area are generally composed of poorly cemented gravel, sand, silt, clay and mud. Old Alluviums, on the other hand, usually consist of poorly consolidated gravel, sand, clay and mud that lies along river terraces and valleys delimited by high hills. These units are observed around the Nurhak district within the study area.



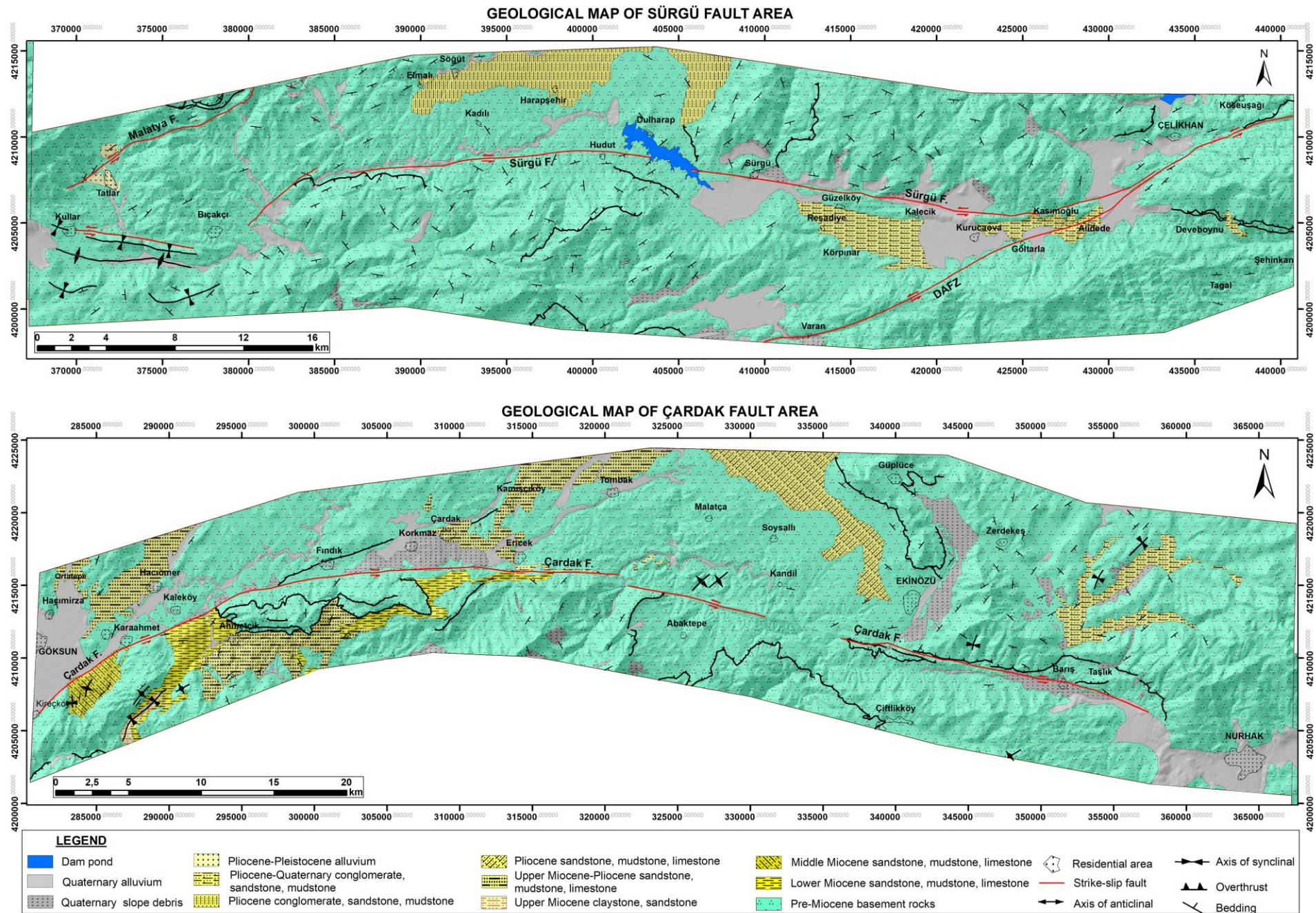


Figure 3. Simplified geology map of the study area (compiled from 1/100.000 scale sheets of MTA (2014) geology database)

Alluvial fans are observed along the Sürgü Fault Zone in the study area. The alluvial fans are predominantly composed of conglomerate, sandstone, siltstone with caliche, and mudstone from the apex toward the toe (Bedi and Yusufoglu, 2018). The Old Alluvial Fan is observed in Reşadiye and Kurucaova villages in the southern sections of the Sürgü fault. These are made up of gravel, sand, silt, and clay-sized materials that were transported from high altitudes by floods. Debris flows mostly detected adjacent to the faults within the study area, they consist of poorly sorted and consolidated blocks, pebbles, and negligible amounts of sand and clay which is formed as a result of sediment flux through steep spurs (Usta et al., 2018).

## 2. Materials and Methods

Morphometric analysis is one of the imperative tools to evaluate and assess the impacts of tectonic activity on the development of geomorphic processes and earth crust's morphology (Keller and Pinter, 2002). To investigate morphological properties of any fault zone and to implement morphometric analysis in the study area, a Digital Elevation Model (DEM) with 10 m ground resolution should be generated utilizing 1/25000 scale digital topographic maps enlisting the ArcGIS program. DEM data can also be generated by downloading raster data (satellite image) with 12.5 m or 30 m resolutions form from different international resources (e.g. NASA or ESA).

In order to perform morphotectonic investigations, the Digital Elevation Model (DEM) of the study area generated from Alos Palsar data (ASF, 2020) with 12.5 m ground resolution, the data were downloaded from <https://search.asf.alaska.edu/#/>. With the utilization of the identical data, the Hill-Shade map of the study area was produced with the ArcGis 10.7 software, and then Sürgü and Çardak faults were integrated into the map. Next, with the aid of ArcHydro Tools within the ArcGis software, the drainage basins and stream networks of the study area were plotted on the DEM data.

Within the scope of this paper, prior to the morphometric indice evaluation, the Rock Strength classification of lithological units within the study area was defined. Then morphometric indice calculations were exercised within the study area. These investigations include implementation of mountain front sinuosity (Smf) along the mountain-piedmont junctions, Valley Floor Width-to-Valley Height ratio (Vf), and Stream Length-Gradient (SL) indice calculations on the drainage networks and basins which cater invaluable information regarding the geomorphologic evolution of the region and the impacts of the tectonic framework on this evolution.

### 2.1. Rock Strength

Since the rock resistance of different lithologies against erosion is vital regarding the interpretation of morphometric indice calculations and results, the rock strength of the different geologic units in the study area are defined. In this context, the lithological units in the study area are split into 5 classes considering the mechanical rock resistance classification defined by Selby (1980) (e.g. Yildirim, 2014; Khalifa, Cakir, Owen, & Kaya, 2018; Sançar, 2018; Topal, 2019). Lithologic units within the study area are classified according to different rock strength categories (i.e. very low strength, low strength, moderate strength, high strength and very high strength).

### 2.2. Mountain Front Sinuosity (Smf)

Mountain front sinuosity is one of the most effective tools to define tectonically active mountain fronts from inactive mountain fronts and it is represented by this formula:  $Smf = Lmf/Ls$  (Keller and Pinter, 2002). Where Lmf is the total length of the lineation throughout the topographic contour along the mountain front and Ls is the distance between two margins of the straight line along the mountain front (Figure 4a). This indice is beneficial to assess the rate of tectonic activity through the mountain front (Keller and Pinter, 2002). Bull (2008) stated that if the Smf indice is below 1.4 it represents a low rate and if the quantity is between 1.4 and 3, it depicts a medium range. Low and medium Smf indexes are an indicator of high tectonic activity along



mountain fronts (Keller and Pinter, 2002). In the study area, a total of 7 Smf calculations were performed, 4 on the Sürgü fault and 3 on the Çardak fault.

### 2.3. Valley Floor Width-to-Valley Height Ratio (Vf)

The valley floor width to valley height ratio indice defines the differences between U-shaped flat-floored valleys (with relatively high Vf values) and V-shaped valleys (with relatively low Vf values; Keller and Pinter, 2002). The valley floor width to the valley height ratio is one of the popular tools to evaluate the ongoing tectonic uplift rate in a region and is defined by this formula:  $Vf = 2 \cdot Vf_{fw} / [(Eld - Esc) + (Erd - Esc)]$  (Keller and Pinter, 2002). Where Vf<sub>fw</sub> indicates the width of the valley floor, Eld and Erd show the heights of the left and right edges of the valley respectively, and the Esc depict valley floor altitude (Figure 4c). Vf indice values are categorized into 3 main classes according to the acquired and evaluated result from different studies by manifold researchers (Silva, Goy, Zazo, & Bardají, 2003; El Hamdouni, Irigaray, Fernández, Chacón, & Keller 2008). Thus, Vf values less than 0.5 show high tectonic activity (Class -1), and if the Vf quantity is confined to the 0.5-1 range, then the tectonic activity is medium (Class-2); finally, Vf values higher than 1 indicate minimum tectonic activity level (Class-3).

### 2.4. Stream Length-Gradient Indice (SL)

Stream length-gradient indice is a powerful tool to evaluate the relationships between tectonic activity, rock resistance, and topography along with bedrock river profiles, and it is represented by this formula:  $SL = \Delta H \times L / \Delta L$  (Figure 4b; Hack, 1973; Keller and Pinter, 2002). Where SL is stream length-gradient index, ΔH is the change in channel altitude, ΔL is the channel length of the measured proportion, and L is the distance from the midpoint of the interested section where the indice is calculated towards upstream of the highest point on profile (Keller and Pinter, 2002; Troiani, Galve, Piacentini, Della Seta, & Guerrero, 2014). Many studies based on the El Hamdouni et al. (2008)'s work (e.g. Köle, 2016; Saber, Isik, & Caglayan, 2018) categorized SL indice values into 3 main tectonic groups: namely class 1: 500 < SL, class 2: 300 < SL < 500, and class 3: SL < 300. In similar sources, the height ranges culled out in SL calculations range from 100 to 250 meters in those studies (e.g. Troiani et al., 2014; Topal, 2019).

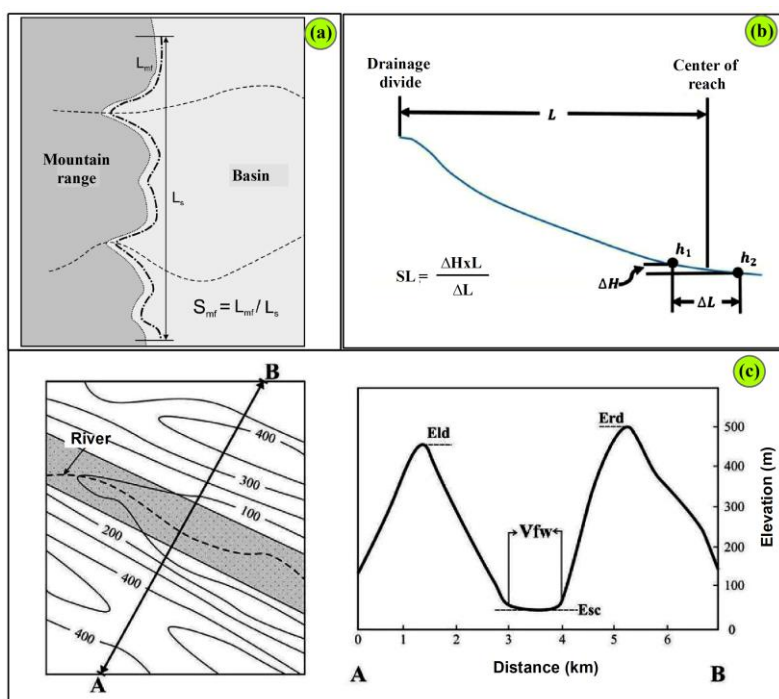


Figure 4. (a): Diagram utilized in the calculation of mountain front sinuosity (Keller and Pinter, 2002). (b): Schematic for the calculation of stream length-gradient indice (Hack, 1973). (c) Parameters used in Vf calculations (Keller and Pinter, 2002).



The lengths of the calculated valleys in this study are relatively short and vary between 3.803 and 15.123 meters; hence, SL measurement interval values are assigned 10 m, 20 m, and 50 m due to the length of the evaluated valleys. Subsequently, since the aforementioned values regarding the tectonic classification of the SL indice correspond to the large-scale studies, they were reformulated and reduced by half. The SL values of this study were divided into 3 tectonic classes: namely class 1:  $250 < SL$ , class 2:  $150 < SL < 250$ , and class 3:  $SL < 150$ .

### 3. Results and Discussion

In this research, the morphotectonic properties of the Sürgü and Çardak faults that constitute a small proportion of the northern branch of the EAFZ were investigated. To support the results of the morphotectonic investigations, geologic features of the study area were discovered with a thorough literature review and performed field studies. Morphometric analysis within this area caters information regarding the geomorphologic evolution of the region and the effects of tectonic activity on this evolution.

#### 3.1. Seismicity of the Sürgü and Çardak Faults

According to historical and instrumental earthquake records, plenty of earthquakes occurred within the Sürgü and Çardak faults' sphere of the influence (Taymaz et al., 1991; Guidoboni, Comastri, & Traina, 1994; Ambraseys, 2009; Duman and Emre, 2013). Over the latest centuries, the most important earthquakes occurred on the EAFZ are; 1513 Pazarcık, 1544 Elbistan, 1822 Antakya, 1866 Karlıova, 1872 Antakya, 1874 Gezin, 1875 Sivrice, 1893 Çelikhan, 1905 Pötürge, 1971 Bingöl, 1977 Palu, 1986 Mayıs-Haziran Sürgü, 1998 Ceyhan, January 24, 2020 ( $M=6.8$ ) Sivrice (Elazığ) earthquakes (Taymaz et al., 1991; Duman and Emre, 2013). Among those events, according to the historical earthquake records, the 1544 Zeytun (Elbistan) earthquake event occurred around the Çardak fault with a magnitude of 6.8 (Ambraseys, 2009; Duman and Emre, 2013). As a result of this event, the previous settlement of Armenian's the Zeytun town (today known as Süleymanlı village in the Kahramanmaraş) and a part of Elbistan were demolished (Ambrassy, 2009). Contemplating all of the aforementioned points and the subtle facts that the Çardak fault runs 23 km north of Süleymanlı and 20 km south of Elbistan, we can boil down the conclusion that, most probably, the Çardak fault was responsible for the 1544 earthquake.

Based on the historical earthquake records (Guidoboni et al., 1994; Ambraseys, 2009), the Arabissus (presently known as Elbistan/Kahramanmaraş) settlement, established by Maurice, a former emperor, was demolished two times as a result of the two major earthquakes in 584/585 AD and 587 AD respectively. Considering the location of Elbistan and the position of the active faults around the neighbouring regions, it is exorbitantly liable that at least one of the 584/585 AD and 587 AD earthquakes were generated by the Çardak fault.

Earthquake records during the instrumental period demonstrate two destructive earthquakes events occurred around the north of the Sürgü fault, in the vicinity of Doğanşehir, on 5th of May ( $M_s=5.8$ ) and 6th of June ( $M_s=5.6$ ) respectively (Taymaz et al., 1991; Yılmaz, 2002; Duman and Emre, 2013). Through instrumental period, there also exist earthquake records on the Çardak fault as well. According to the data represented by the Boğaziçi University Kandilli Observatory and Earthquake Research Institute National Earthquake Monitoring Center (KOERI-RETMC, 2021), in 1922, in the southwest of Ekinözü (Kahramanmaraş), an earthquake event occurred with a magnitude of 5.5; furthermore, in 1978, another event with a magnitude of 5.0 arise in the vicinity of Nurhak (Kahramanmaraş; Figure 5).

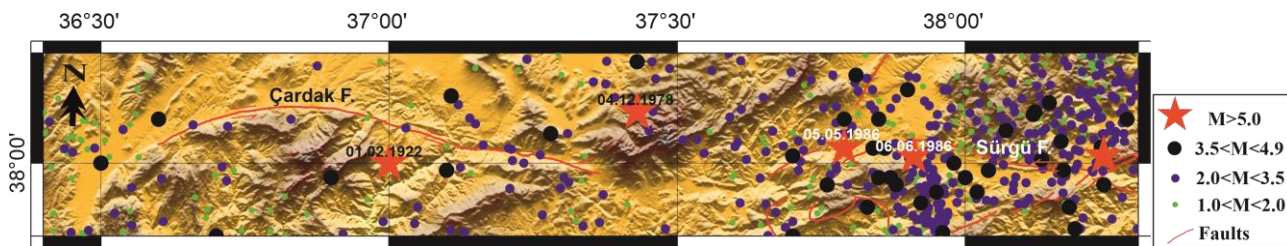


Figure 5. Distribution of the earthquakes within the study area and neighbouring regions throughout the instrumental period (1900-2021; KOERI-RETMC, 2021).

### 3.2. Morphometric Analysis

Offsets along different streams were detected at various locations along the Sürgü and Çardak faults enlisting the field operations, Google Earth images, and the analyzed stream networks on the DEM (Figure 6). Along the valleys located at the east of Sürgü village (Doğanşehir/Malatya), systematic sinistral offsets with a maximum displacement of 330 meters were detected, this phenomenon simply indicates the powerful effect of the Sürgü fault on these stream network (Figure 6a). In the western part of the Sürgü fault, around the south of Tatlar village, a left lateral offset was observed throughout the Tatlar River with approximately 1 km displacement (Figure 6b). In the central part of the Çardak fault, about 16 km west of Ekinözü district (Kahramanmaraş), 280 m of offset detected along the Kılıncımpınar Stream (Figure 6c). Further, at the western margin of the Çardak fault, leftward offsets of up to 216 meters were observed in the streams flowing into Göksun Stream around Aslanbey farm (Göksun/Kahramanmaraş; Figure 6d). Contemplating all of the results and field evidences, it may be stated that the Sürgü and Çardak faults are active left-lateral strike-slip faults.

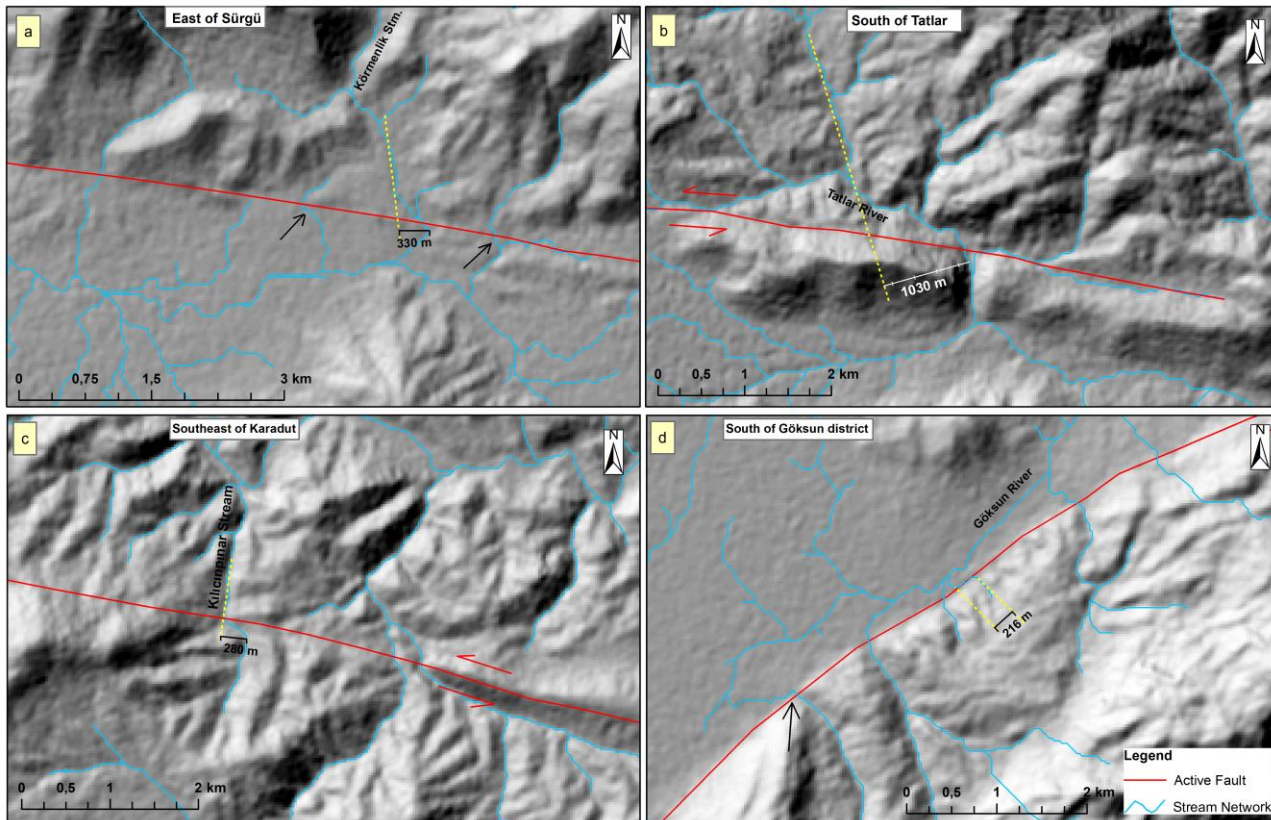


Figure 6. The stream offsets detected throughout the Sürgü fault (a: east of Sürgü district, b: south of Tatlar village) and Çardak fault (c: west of Ekinözü, d: around Aslanbey farm). The black arrows indicate the offsets that were not measured.

By and large, morphometric indices assessments are exercised to evaluate the impacts of regional tectonic activity. The quantitative outcomes of morphometric data can be utilized to understand the geomorphological evolution of large domains or to contrast different segments of an active fault (Keller and Pinter, 2002; Selçuk, 2016; Topal, Keller, Bufer, & Koçyiğit, 2016; Basmenji et al., 2021). In this study, morphometric analyzes like Rock Strength Classification, Mountain Front sinuosity (Smf), Valley Floor Width-to-Valley Height Ratio (Vf), Stream Length-Gradient Index (SL) were performed.

### 3.2.1. Rock Strength

According to the rock resistance classification defined by Selby (1980), the lithological units in the study area are classified into 5 categories: namely very low strength (alluvium, debris flow, alluvial fan deposits), low strength (conglomerate, sandstone, limestone, mudstone, siltstone, claystone), medium strength (schist, phyllite, serpentinite), high strength (basalt, diabase) and very high resistant (marble, quartzite, gneiss). Based on this classification, rock units with very high and low strengths cover a great proportion in the study area. Rocks with high resistance are observed only in the SE of the Sürgü fault. Rocks with the medium are sporadic throughout the study area. Very low strength lithological units, however, are observed along valleys and basins that are bounded by the faults in the study area (Figure 10).

### 3.2.2. Mountain Front Sinuosity (Smf)

Along tectonically active mountain fronts uplifts rate prevail over erosional processes, and demonstrate low Smf values. On the other hand, dominant erosional processes along mountain-piedmont junction denote high Smf values (Keller and Pinter, 2002; Silva et al., 2003). Overall, in this study, 7 Smf values were calculated totally, 4 on the Sürgü fault and 3 on the Çardak fault. Along the eastern part of the Sürgü fault, parallel to an extending ridge, the Sürgü 1 segment depicts Lmf and Ls values of 23.465 and 18.185 m respectively. Thus, here the mountain front sinuosity (Smf) has been calculated as 1.29 (Figure 7). Around the southern section of the fault, at the southern boundary of the Kurucaova basin, two Smf values were also calculated. The Sürgü 2 segment yield Lmf: 23.162 m, Ls: 15.665 m, and Smf: 1.48, yet through the Sürgü 3, the Lmf and Ls values are 10.032 and 7.330 m respectively. These quantities indicate 1.37 for the Smf. The Smf calculations along the Sürgü 4 segment (the middle segment of the Sürgü fault) denote Lmf: 22.230 m, Ls: 17.085 m, and Smf: 1.30 (Figure 7). The obtained values along the Sürgü fault demonstrate that the tectonic forces are more impactful in terms of the basin development, in comparison to the erosional processes here.

Through the Çardak 1 segment, within a basin in the eastern part of the Çardak fault, Lmf and Ls were calculated as 16.693 and 13.818 m; thus, Smf value is 1.21 (Figure 8a). Since the western part of the Çardak fault represents a curved geometry, two Smf assessments were conducted along the mountain fronts in this location (Figure 8b). Smf measurements on the Çardak 2 segment imply values of 23.323 and 16.631 m for Lmf and Ls respectively which provide 1.40 for Smf indice along this segment. Finally, around the western section of the Çardak fault, Lmf and Ls measured as 30.565 and 25.049 m. Therefore, Smf for Çardak 3 segment was calculated as 1.22 (Figure 8b). The measured Smf quantities on the Çardak fault indicate that tectonic activities are effective elements in governing the basin developments along the related faults.

### 3.2.3. Valley Floor Width-to-Valley Height Ratio (Vf)

The ratio of valley floor width to valley height ratio is one of the popular and beneficial indices to evaluate the tectonic uplift rate in a region. "V" shaped valleys with low Vf values indicate high uplift rates in a region. On the other hand, high Vf quantities represent that the uplift rate is low, for domination of erosional processes over tectonic activities (Keller and Pinter, 2002; Silva et al., 2003). In this study, Vf values associated with the river channels along the mountain fronts were calculated; besides, it is aimed to classify the relative tectonic activities and uplift rates of the different fault segments. Thereby, Vf profiles were plotted with an approximately 180-meter interval for each valley (starting from the outlet point along the mountain front towards upstream) and Vf values calculated immaculately for each profile. In this study, a total of 122 Vf



values were calculated within the study area, 53 through the drainage basins associated with the Sürgü fault, and 69 along the drainage basins associated with the Çardak fault. Last but not least, Vf values averaged for each valley and mean Vf values were calculated for each segment. For this purpose, 16 valleys on the Sürgü fault and 20 valleys on the Çardak fault have been utilized (Figures 7 and 8). These values and their associated Smf values are given in Table 1.

The average Vf values for the Sürgü fault and its southern parts vary between 0.42 and 1.09 (Figure 7, Table 1). Except from the value of 1.09 obtained from a valley (S2v2) at the southern part of the fault, the Sürgü Fault's Vf values indicate high (class-1) and moderate (class-2) tectonic activity levels. The average Vf values recorded for the valleys associated with the Çardak fault range between 0.20 and 1.12 (Figure 8, Table 1). Similarly, in this section, the average Vf value calculated along solely one valley (C2v5) was higher than 1 (1.12). Apart from that, the Vf values associated with the Çardak fault indicate high (class-1) and moderate level (class-2) tectonic activity.

Some studies, state that there is a relative relationship between Vf values and Smf quantities and relative tectonic activity of faults evaluated based on this relative relation (Rockwell, Keller, & Johnson, 1984; Silva et al., 2003). Pondering the calculated Smf and Vf values related to the Sürgü fault, it is evident that the uplift and tectonic activity rate along the Sürgü fault (the Sürgü 1 and Sürgü 4 segments) are relatively higher than the southern section of the fault (the Sürgü 2 and Sürgü 3 segments). Moreover, along the Çardak fault, it is conspicuous that the segments located in eastern and western margins (the Çardak 1 and Çardak 3) reflect higher tectonic activity and uplift compared to the middle part (the Çardak 2 segment; Table 1 and Figure 9).

A combination of the calculated Smf values and the average Vf value of each valley throughout the Sürgü and Çardak faults indicate a good correlation between Vf and Smf values with  $R^2 = 0.8682$  (Figure 9). Overall, the results of Smf and Vf analysis in the study area indicate that the Sürgü and Çardak faults have high tectonic activity (Class I; Figure 9).

Table 1.

Smf and average Vf quantities calculated along the mountain fronts of the Sürgü and Çardak faults.

Sürgü Fault				Çardak Fault			
Smf name	Smf value	Valley name	Vf avr.	Smf name	Smf value	Valley name	Vf avr.
Sürgü1	1,29	S1v1	0.49	Çardak1	1,21	C1v1	0.72
		S1v2	0.68			C1v2	0.43
		S1v3	0.42			C1v3	0.65
Sürgü2	1,48	S2v1	0.65			C1v4	0.48
		S2v2	1,09			C1v5	0.40
		S2v3	0.73			C1v6	0.59
		S2v4	0.61			C1v7	0.20
		S2v5	0.50	C2v1	0.50		
Sürgü3	1,37	S3v1	0.62	Çardak2	1,40	C2v2	0.58
		S3v2	0.62			C2v3	0.81
		S3v3	0.65			C2v4	0.56
		S3v4	0.86			C2v5	1,12
Sürgü4	1,30	S4v1	0.63			Çardak3	1,28
		S4v2	0.73	C3v2	0.54		
		S4v3	0.46	C3v3	0.93		
		S4v4	0.51	C3v4	0.34		
				C3v5	0.38		
				C3v6	0.56		
				C3v7	0.35		
				C3v8	0.38		

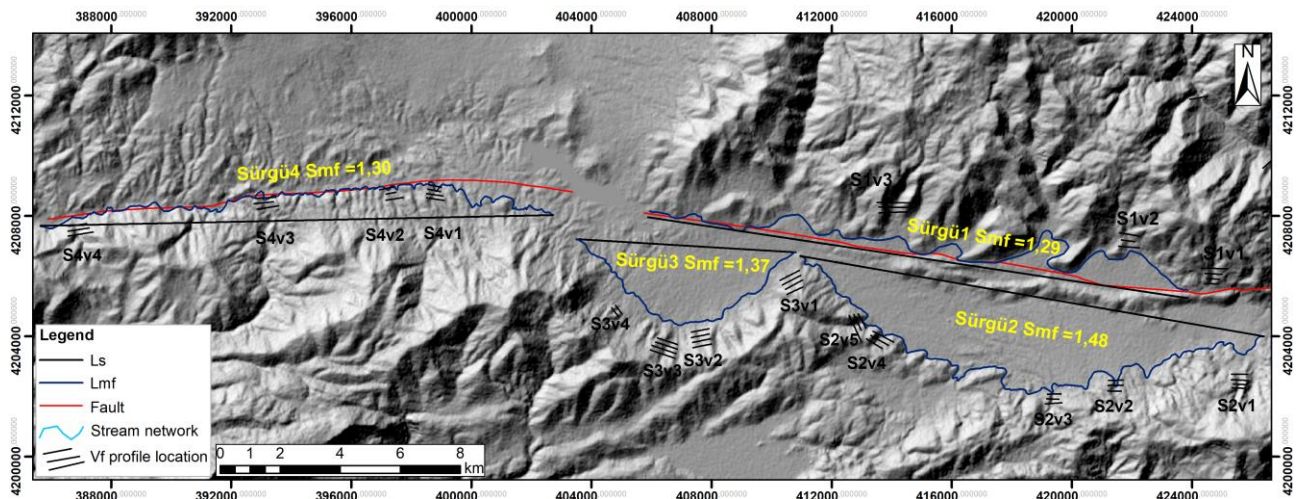


Figure 7. The calculated Smf values and locations of the Vf profiles along the Sürgü fault and associated mountain fronts located at the southern section of the fault.

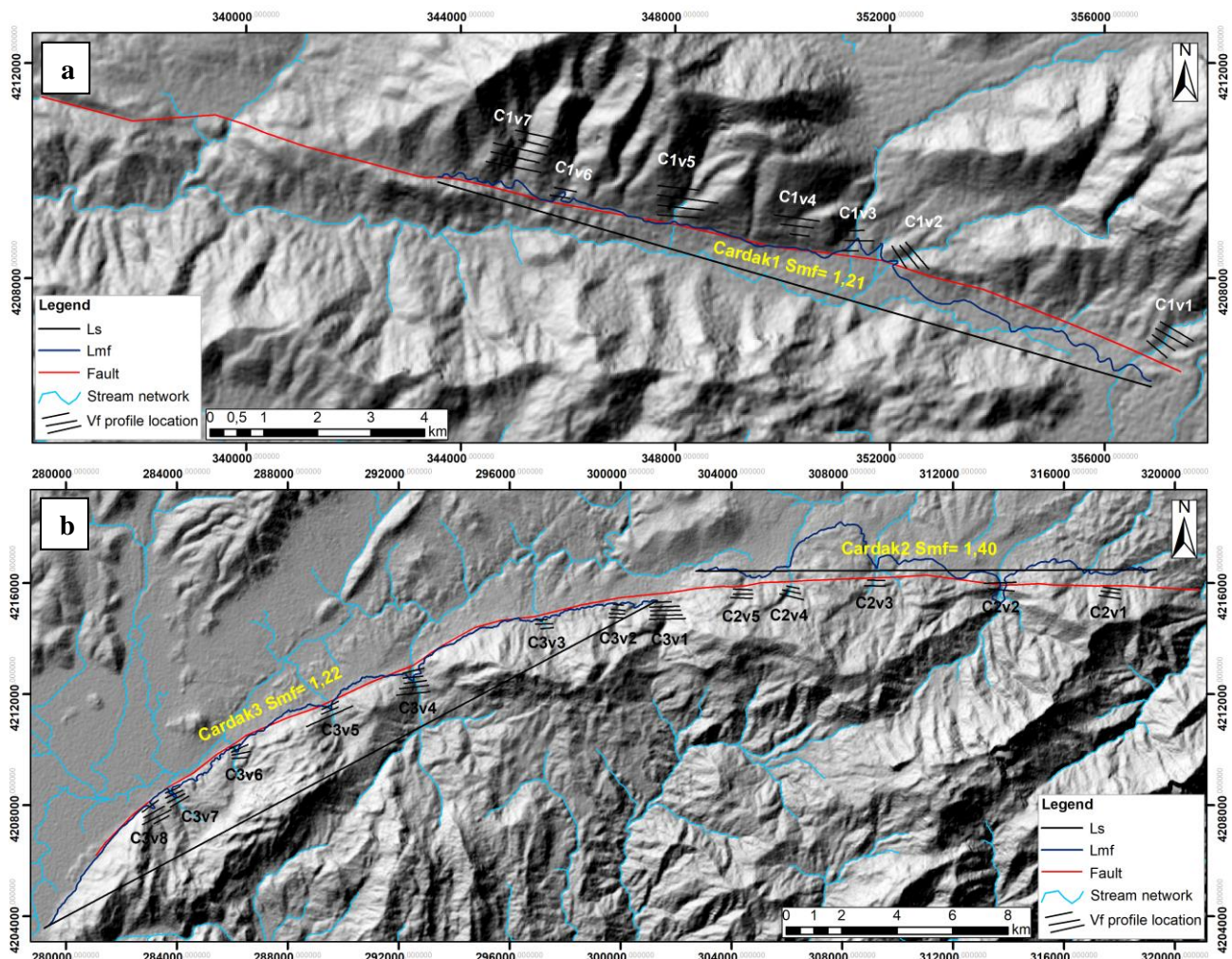


Figure 8. The Smf values calculated in the east (a) and west (b) sections of the Çardak fault and the locations of the plotted Vf profiles along the analyzed valleys.



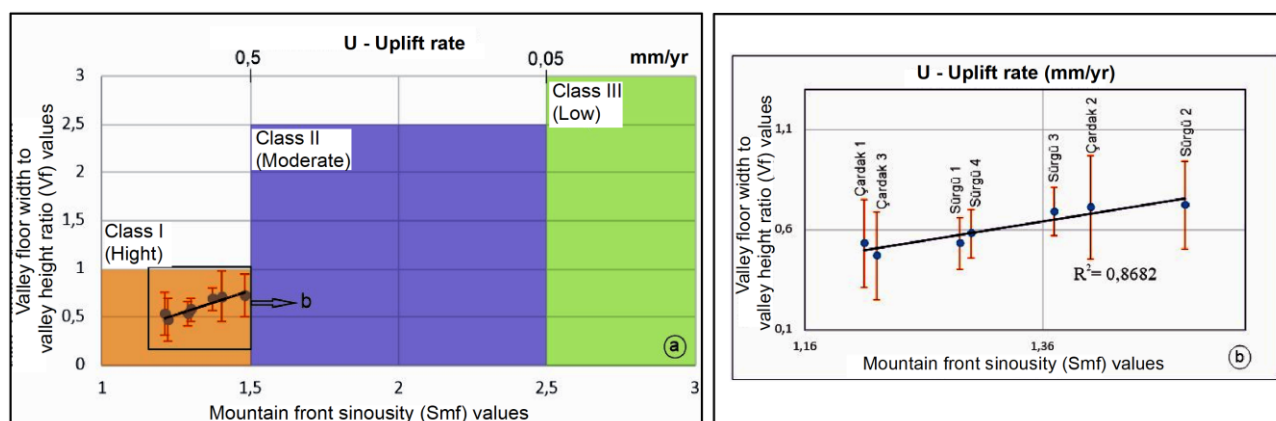


Figure 9. The graph demonstrates the uplift rates (a) and the correlation (b) of Smf and Vf values calculated along the mountain fronts in the study area (Rockwell et al., 1984).

### 3.2.4. Stream Length-Gradient Index (SL)

In this study, SL calculation interval values were defined as 10 m, 20 m, and 50 m based on the length of the evaluated valley. Acquired SL values by surveying the valleys in the study area are divided into 3 tectonic classes, namely class 1:  $250 < SL$ , class 2:  $150 < SL < 250$ , and class 3:  $SL < 150$ .

As a framework of this investigation, a total number of 77 SL indices were calculated along 10 valleys, more precisely 6 on the Sürgü fault and 4 on the Çardak fault. Performed calculations started at the highest upstream point along the valleys which are positioned perpendicular to the fault's strike, and then the fault was transcended; finally, calculations at the outlet point where the stream meets the main river completed. The obtained SL values range from 5.8 to 1330.0, and the greatest anomalies were observed at the east of the Çardak fault (Çardak SL.1), across a distinct mountain front which evolved and controlled by the fault (Figures 10 and 11b).

Within an area without lithological differentiations, change in morphology, and tectonic activity, the SL indice values are prospected to reflect an ascending trend without showing anomalies (Köle, 2016). Analysis of the thalweg profiles of SL indices along the Sürgü fault indicates that the Sürgü SL.0, SL.1 and SL.4 values only show minuscule anomalies and they stood at the "class 3" range in the tectonic classification (based on the SL indice anomaly classification; Figure 10). Examination of the Sürgü SL.2, SL.3, and SL.5 profiles in and around the Sürgü fault demonstrate that the SL indice values depict high anomaly values and fall in the "class 1" and "class 2" tectonic classification range (Figure 10). When the Sürgü SL.3 profile is examined, it is observed that it shows high anomaly (331.8) around the fault (Figure 11a).

SL values measured along the linear valleys shaped by strike-slip faults are expected to stand at low quantities due to the acute impacts of denudation on the rocks along the fault zone (Keller and Pinter, 2002). It was observed that the average value of SL indice (Sürgü SL.0) through a collateral valley along the fault strike in the eastern part of the Sürgü fault was only 31.

Assessment of the thalweg profiles of SL indices along the Çardak fault, which is the second active structure in the study area, represent that the values along the Çardak SL.4 valley show a trivial anomaly and difference; hence, it is stood at the "class 3" value range according to the tectonic classification based on the SL indice anomaly ratio (Figure 10). Evaluation of the Çardak SL.1, SL.2, and SL.3 profiles yield high anomaly values for the SL indice ("class 1" and "class 2" according to the tectonic classification) in and around the Çardak fault (Figures 10 and 11b). Stream length-gradient indice analysis reveals that the Sürgü and Çardak faults play an essential role in the evolution and development of the tectonic regimes in the study area.

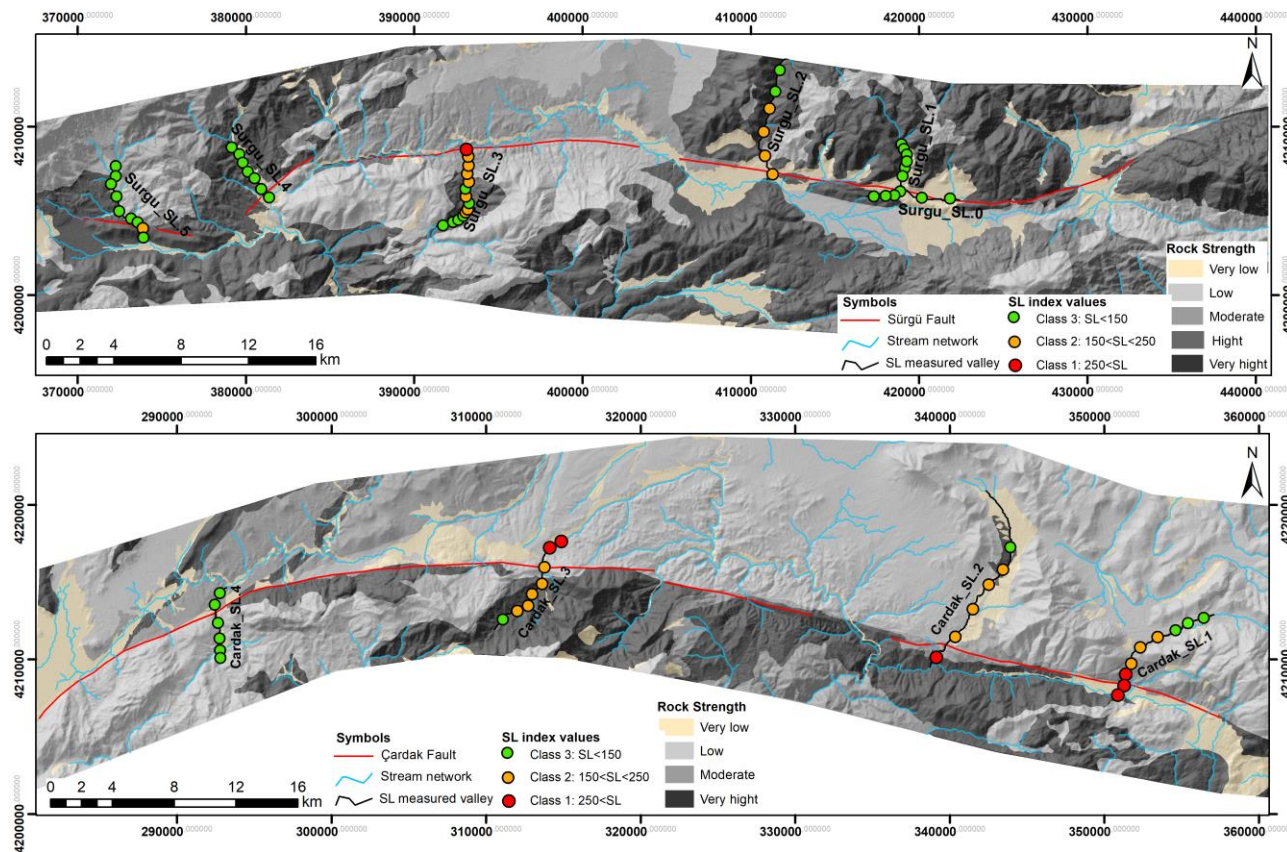


Figure 10. The map shows the locations and tectonic classes of SL indices and the rock strength classification of the different lithological units in the study area based on Selby (1980)’s fundamental rock resistance definitions.

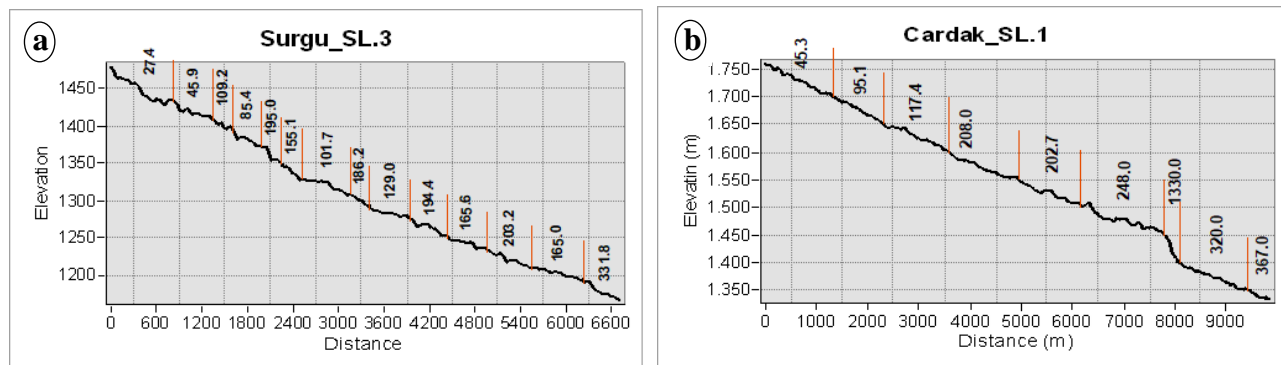


Figure 11. Longitudinal river profiles with high anomalies associated with the Sürgü (a) and Çardak (b) faults.

4. Conclusion

In this study, the morphotectonic properties and characteristics of the Sürgü and Çardak faults were discovered. Enlisting the field studies, Google Earth images, and the plotted stream network on the DEM data, stream offsets were detected along the Sürgü and Çardak faults at a different location within the study area. These observations reveal that the Sürgü and Çardak faults represent active sinistral strike-slip fault morphology. Within the framework of morphometric indice calculations, a total number of 7 mountain front sinuosity (Smf) values were calculated in the study area, 4 on the Sürgü fault and 3 on the Çardak fault. The variation of the Smf values between 1.21 and 1.48 indicate domination of the tectonic activity over the denudation process along the basin within the study area. In the study area, average Vf values were calculated from 16 and 20 valleys along the mountain fronts of the Sürgü fault and Çardak faults. Overall, the calculated average Vf values vary between 0.20 and 1.12. The combination of the calculated Smf and Vf values within

the study area indicate high activity for the Sürgü and Çardak faults. The observed high stream length-gradient indice (SL) anomalies on the Sürgü and Çardak faults and adjacent landscapes along the 77 profiles throughout 10 valleys in the study area shows that these faults play an active role in the tectonic evolution of the region. Eventually, morphometric investigations cater valuable information about the geomorphologic evolution of the region and the effects of the tectonic process on this evolution.

### Acknowledgement

This study constitutes a part of Musa Balkaya's doctoral thesis. The study was supported by FDK-2019-2979 and 120Y102 projects which were funded by the Çanakkale Onsekiz Mart University Scientific Research Projects Coordination Unit and by the TÜBİTAK 1002 Quick Support Projects. We are grateful to ÇOMÜ-BAP unit and TÜBİTAK for their support. Thanks to Prof. Dr. Tolga Bekler for his contributions to the instrumental period earthquake records subject, to Dr. Taylan Sançar for theoretical background on morphometric indices and to Mehran Basmenji for english translation of the manuscript.

### Author Contributions

Musa Balkaya: Conducted morphometric analysis, attended field studies and wrote the article.

Süha Özden: Contributed to data evaluation and interpretation of the results.

H. Serdar Akyüz: Attended to field studies, contributed to the evaluation of the data and interpretation of the results.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

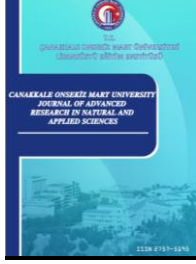
- Ambraseys, N. (2009). Earthquakes in the Mediterranean and Middle East: a multidisciplinary study of seismicity up to 1900. Cambridge University Press.
- ASF, (2020). Alaska Satellite Facility Data Search User Manual, Retrieved from: <https://search.asf.alaska.edu/#/>
- Basmenji, M., Sancar, T., Dikbas, A., Boulton, S., & Akyuz, H. S. (2021). Tectonic geomorphology of the Yatağan Fault (Muğla, SW Turkey): implications for quantifying vertical slip rates along active normal faults. DOI: <http://dx.doi.org/10.3906/yer-2010-11>
- Baydar, O. & Yergök, A. F. (1996). Güneydogu Anadolu-Kenar Kıvrım Kusagı-Amanos Dağları Kuzeyi ve Dogu Torosların Jeolojisi. Geological Studies Department, Ankara, 90p (unpublished).
- Bedi, Y., & Yusufoglu, H. (2018). 1/100.000 ölçekli Türkiye Jeoloji Haritaları, Malatya-L40 paftası, no: 261, MTA Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Bull, W.B. (2008). Tectonic geomorphology of mountains: a new approach to paleoseismology. John Wiley and Sons, Oxford, 315 s.
- Çoban, M., & Dalkılıç, H. (2018). 1/100.000 ölçekli Türkiye Jeoloji Haritaları, Şanlıurfa-M39 paftası, no: 262, MTA Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Duman, T.Y., & Emre, O. (2013). The East Anatolian fault: geometry, segmentation and jog characteristics. GeolSoc 372:495–529. DOI: <https://doi.org/10.1144/SP372.14>
- El Hamdouni, R., Irigaray, C., Fernández, T., Chacón, J., & Keller, E. A. (2008). Assessment of relative active tectonics, southwest border of the Sierra Nevada (southern Spain). Geomorphology, 96(1-2), 150-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2007.08.004>
- Emre, Ö., Duman, T. Y., Özalp, S., Elmacı H., Olgun Ş., & Şaroğlu F. (2013). Active fault map of Turkey with an explanatory text 1:1,250,000 scale. General Directorate of Mineral Research and Exploration, Special Publication Series 30.
- Emre, Ö., Duman, T. Y., Özalp, S., Şaroğlu, F., Olgun, Ş., Elmacı, H., & Çan, T. (2016). Active fault database of Turkey. Bulletin of Earthquake Engineering, 1-47. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10518-016-0041-2>
- Guidoboni, E., Comastri, A., Traina, G., & Rom Istituto Nazionale di Geofisica. (1994). Catalogue of Ancient Earthquakes in the Mediterranean Area up to the 10th Century (p. 504). Rome: Istituto nazionale di geofisica.



- Hack, J. T. (1973). Stream-profile analysis and stream gradient index. *Journal of Research of the US Geological Survey*, 1 (4), 421-429.
- Herece, E. (2008). Doğu Anadolu Fayı (DAF) Atlası. General Directorate of Mineral Research and Exploration. Special Publications, Ankara, Serial Number, 13, 359.
- Khalifa, A., Cakir, Z., Owen, L., & Kaya, Ş. (2018). Morphotectonic analysis of the East Anatolian Fault, Turkey. *Turkish Journal of Earth Sciences*, 27(2), 110-126. DOI: <https://doi.org/10.3906/yer-1707-16>
- Keller, E.A., & Pinter, N. (2002). *Active tectonics: Earthquakes, Uplift, and Landscape* (2nd Edn.): New Jersey, PrenticeHall, 432 p.
- Koç, A. (2005). Remote Sensing Study of Sürgü Fault Zone (Malatya, Turkey). Master Thesis (Unpublished), Ankara.
- Koç, A., & Kaymakci, N. (2013). Kinematics of Sürgü Fault Zone (Malatya, Turkey): A remote sensing study, *Journal of Geodynamics*, 65, 292-307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jog.2012.08.001>
- KOERI-RETMC, (2021). Boğaziçi University Kandilli Observatory and Earthquake Research Institute - Regional Earthquake-Tsunami Monitoring Center. Retrieved from: <http://www.koeri.boun.edu.tr/sismo/zeqdb/indexeng.asp>
- Kop, A., Ezer, M., Bodur, M. N., Darbaş, G., Inan, S., Ergintav, S., ... & Yalçın, C. (2014). Geochemical Monitoring Along the Türkoğlu (Kahramanmaraş)-Gölbasi (Adıyaman) Segments of the East Anatolian Fault System. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 39(7), 5521-5536. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13369-013-0912-7>
- Köle, M.M. (2016). Devrez Çayı vadisinin tektonik özelliklerinin morfometrik indisler ile araştırılması, İstanbul Üniversitesi, Edebiyat Fakültesi Coğrafya Dergisi, 33, 21-36. Retrieved from: <http://www.journals.istanbul.edu.tr/iucografya>.
- McClusky, S., Balassanian, S., Barka, A., Demir, C., Ergintav, S., Georgiev, I., ... & Kastens, K. (2000). Global Positioning System constraints on plate kinematics and dynamics in the eastern Mediterranean and Caucasus. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 105(B3), 5695-5719. DOI: <https://doi.org/10.1029/1999JB900351>
- MTA, (2014). 1/100.000 ölçekli Türkiye Jeoloji Haritaları, Elbistan-L37 ve L38, Malatya-L39 ve L40, Gaziantep-M37 ve M38, Şanlıurfa-M39 ve M40 paftaları. Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Türkiye Jeoloji Veri Tabanı, Jeoloji Etütleri Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- Nalbant, S. S., McCloskey, J., Steacy, S., & Barka, A. A. (2002). Stress accumulation and increased seismic risk in eastern Turkey. *Earth and Planetary Science Letters*, 195(3-4), 291-298. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(01\)00592-1](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(01)00592-1)
- Özdemir, M. A., & İnceöz, M. (2003). Doğu Anadolu fay zonunda (Karlıova-Türkoğlu Arasında) akarsu ötelenmelerinin tektonik verilerle karşılaştırılması. *Afyon Kocatepe Ü. Sosyal B. dergisi*, cilt: 5 sayı: 1
- Perinçek, D., & Kozlu, H. (1984). Stratigraphy and Structural Relations of the Units in the Afşin - Elbistan - Doğanşehir Region (Eastern Tauros). In: *Geology of Tauros Belt* (eds., O. Tekeli and M.C. Göncüoğlu). MTA, p.181-198.
- Reilinger, R., McClusky, S., Vernant, P., Lawrence, S., Ergintav, S., Cakmak, R., ... & Nadariya, M. (2006). GPS constraints on continental deformation in the Africa-Arabia-Eurasia continental collision zone and implications for the dynamics of plate interactions. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 111(B5). DOI: <https://doi.org/10.1029/2005JB004051>
- Rockwell, T.K., Keller, E.A., & Johnson, D.L. (1984). Tectonic geomorphology of alluvial fans and mountain fronts near Andntura, California. *Tectonic Geomorphology*, 183-207.
- Saber, R., Isik, V., & Caglayan, A. (2018). Assessment of relative tectonics activity along Aras Valley (NW Iran) using morphometric indices. Paper presented at: The 36th national and the 3rd international geosciences congress, Tehran, Iran.
- Sançar, T. (2018). Yüksekova Havzası'nın (Güneydoğu Türkiye) Yükselim Hızı Tarihçesi'nin Araştırılması. *Türkiye Jeoloji Bülteni*, 61(2), 207-240. DOI: <https://doi.org/10.25288/tjb.439182>
- Selby, M. J. (1980). A rock mass strength classification for geomorphic purposes: with tests from Antarctica and New Zealand. *Zeitschrift für Geomorphologie Stuttgart*, 24 (1), 31-51.
- Selçuk, A. S. (2016). Evaluation of the relative tectonic activity in the eastern Lake Van basin, East Turkey. *Geomorphology*, 270, 9-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2016.07.009>
- Silva, P.G., Goy, J.L., Zazo, C., & Bardají, T. (2003). Fault generated mountain fronts in southeast Spain: Geomorphologic assessment of tectonic and seismic activity. *Geomorphology* 50, 203-225. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-555X\(02\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0169-555X(02)00215-5)
- Sunkar, M., Günek, H., & Canpolat, C. (2008). Kurucaova ve Yakın Çevresinin (Malatya) Jeomorfolojisi. *Fırat Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi Cilt: 18, Sayı: 2 Sayfa: 1-22, Elazığ*.

- Şaroğlu, F., Emre, O., & Kuşçu, I. (1992). The East Anatolian Fault Zone of Turkey. *Annalae Tectonicae* 6, 99–125.
- Şengör, A.M.C., (1980). Türkiye'nin neotektoniğinin esasları, Türkiye jeoloji Kurumu, Konferans serisi: 2, Ankara.
- Taymaz, T., Eyidoğan, H., & Jackson, J. (1991). Source Parameters of Large Earthquakes in the East Anatolian Fault Zone (Turkey). *Geophys. J. Int.* 106, 537–550. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-246X.1991.tb06328.x>
- Topal, S., Keller, E., Bufe, A., & Koçyiğit, A. (2016). Tectonic geomorphology of a large normal fault: Akşehir fault, SW Turkey. *Geomorphology*, 259, 55-69. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2016.01.014>
- Topal, S. (2019). Evaluation of relative tectonic activity along the Priene-Sazlı Fault (Söke Basin, southwest Anatolia): Insights from geomorphic indices and drainage analysis. *Journal of Mountain Science*, 16(4). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11629-018-5274-x>
- Troiani, F., Galve, J. P., Piacentini, D., Della Seta, M., & Guerrero, J. (2014). Spatial analysis of stream length-gradient (SL) index for detecting hillslope processes: a case of the Gállego River headwaters (Spain). *Geomorphology*, 214, 183-197. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2014.02.004>
- Usta, D., Ateş, Ş., Çoban, M., Deveci, Ö., Ekmekyapar, A., Sağlam F. M., Vural, A., & Dinç, S. (2018). 1/100.000 ölçekli Türkiye Jeoloji Haritaları, Şanlıurfa-M40 paftası, no: 263, MTA Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Westaway, R. (2004). Kinematic Consistency between the Dead Sea Fault Zone and The Neogene and Quaternary Left-Lateral Faulting in SE Turkey. *Tectonophysics*, 391, 203–237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2004.07.014>
- Yıldırım, C. (2014). Relative tectonic activity assessment of the Tuz Gölü fault zone; Central Anatolia, Turkey. *Tectonophysics*, 630, 183-192. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2014.05.023>
- Yılmaz, H., (2002). Sürğü Fayının Neotektonik Özellikleri. *Cumhuriyet Üniv. Müh. Fak. Dergisi, Seri A-Yerbilimleri* cilt: 19 sayı: 5sayfa 35-46, Sivas.
- Yönlü, Ö., Altunel, E., Karabacak, V., & Akyüz, H. S. (2013). Evolution of the Gölbaşı basin and its implications for the long-term offset on the East Anatolian Fault Zone, Turkey. *Journal of Geodynamics*, 65, 272-281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jog.2012.04.013>





## Kavak Çayı (Gelibolu, Çanakkale ) Mollusca Faunası ve Bazı Su Kalitesi Özelliklerinin Belirlenmesi

Demet Bal<sup>1</sup>, Deniz Anıl Odabaşı<sup>2\*</sup>, Aytuğ Zilifli<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Sınırlı Sorumlu Su Ürünleri Kooperatifleri Birliği, No:2, Efeler, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup> Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>3</sup> Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

### Makale Tarihiçesi

Gönderim: 09.02.2021

Kabul: 19.08.2021

Yayın: 20.09.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** – Marmara havzasının Batısında bulunan Kavak Çayının sucul Gastropoda ve Bivalvia faunası ile bazı su kalitesi özelliklerinin araştırılmasını amaçlayan bu çalışmada, Kavak Çayı havzasından seçilen beş istasyondan 2016 yılı içerisinde, makro-omurgasız taban faunası ve su örneklemeleri mevsimsel olarak gerçekleştirilmiştir. Standart örnekleme yöntemleri kullanılarak yapılan taban faunası örneklemelerinden sonra taban faunasındaki gastropod ve bivalv örneklerine ait bireylerin tür teşhis ve sayımları laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Mollusca türlerinin istasyonlara göre birey sayısı, baskınlık ve frekans değerleri hesaplanmıştır. Bunun yanında, tespit edilen türlerin tolerans değerleri de verilmiştir. Örnekleme istasyonlarında yerinde ölçülen su sıcaklığı, çözülmüş oksijen (doğunluk ve yoğunluk), pH, toplam çözülmüş katılar, elektrik iletkenliği gibi parametreler kaydedilmiştir. Diğer su kalitesi parametrelerinden nütrient ve bazı elementler ise laboratuvarında iyon kromatografisi cihazı ile analiz edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, araştırma bölgesinde sucul molluska faunasına ait toplam 17 takson belirlenmiştir. Yerinde ve laboratuvarında ölçülen su kalitesi parametreleri Türkiye Su Kalitesi Kontrolü Yönetmenliğine göre karşılaştırıldığında, örnekleme istasyonlarının ölçülen parametrelere göre birinci (en yüksek) ve dördüncü kalite (en düşük) sınıfları arasında oldukları belirlenmiştir. Özellikle çözülmüş oksijen ve Alüminyum gibi bazı parametrelerin etkisiyle su kalitesi sınıflarının düştüğü gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, Kavak Çayı ve havzasında belirli su kalite parametrelerinin su kalitesini kötüleştiği, buna bağlı olarak da, ortamda yaşayan molluska faunası kompozisyonunun genel olarak organik kirliliğe toleranslı türlerden oluştuğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler** – Bivalvia, Çanakkale, ekolojik tolerans, gastropoda, su kalitesi

## Determination of Mollusca Fauna and Some of The Water Quality Features of Kavak Stream (Gelibolu Peninsula: Çanakkale)

<sup>1</sup>Limited Liability of Fisheries Cooperatives Association, No:2, Efeler District, Aydın, Turkey

<sup>2</sup>Faculty of Marine Science and Technology, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>3</sup>School of Graduate Studies , Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

### Article History

Received: 09.02.2021

Accepted: 19.08.2021

Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** –This study aimed at determining the Mollusca fauna and some water quality features of Kavak Stream located on the Western part of the Marmara Basin. Therefore, sampling studies on macrozoobenthos and water were conducted on the pre-selected five sampling stations seasonally, in the year of 2016. After the benthos samplings carried out using standard methods, taxonomic identifications of the gastropods and bivalves were done and individual numbers were carried out in the laboratory. Abundance, dominance, and frequency of the Mollusca were calculated. Besides, taxa tolerance values of the identified taxa were also given. Some physical and chemical parameters of water such as temperature, oxygen saturation, pH, dissolved solids, and conductance were recorded during the field study. Other water quality parameters such as nutrients and some elements were analysed in the laboratory using ion chromatography. According to the data of the present study, seventeen taxa were identified belong to the aquatic Mollusca fauna. The environmental variables both recorded in the field and analysed in the laboratory were between first (the highest) and fourth (the lowest) class when compared with Water Quality Criteria Legislation of Turkey. Especially, the dissolved oxygen and Aluminium concentrations decreased the water quality class in the stations was observed. In conclusion, deteriorated the water quality under the influence of some parameters, accordingly the inhabitant Mollusca fauna composition were tolerant to organic pollution was observed.

**Keywords** – Bivalvia, Çanakkale, ecological tolerance, gastropoda, water quality

<sup>1</sup> [sahra092@hotmail.com](mailto:sahra092@hotmail.com)

<sup>2</sup> [aodabasi@comu.edu.tr](mailto:aodabasi@comu.edu.tr)

<sup>3</sup> [aytugzilifli@gmail.com](mailto:aytugzilifli@gmail.com)

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Sucul ekosistemler sürekli olarak çeşitli kaynaklardan gelen kirletici insan faaliyetlerinin etkisi altındadır ([Salanki, Salanki, Kamardina ve Rozsa, 2003](#)). Sucul ekosistemler içinde akarsular ise en fazla baskısına maruz kalan ve ilk olarak etkilenen ortamlardır. Bu nedenle sürekli olarak su kimyası kalitesi ve ekolojik kalite anlamında kontrol edilmesi gerekmektedir ([Hering vd., 2006](#)). Biyolojik indikatörler, sucul ekosistemlerin kalitesinin izlenmesinde uzunca bir süredir kullanılmaktadır ([Rosenberg ve Resh, 1993](#)). Su zeminine bağlı olarak yaşayan (taban omurgasızları, fitobentoz, makroalg gibi) komünitelerin çevresel değişkenlerle etkileşimleri, yalnızca mevcut durumu değil aynı zamanda uzun bir zaman dilimi içerisinde oluşan etkilerin gösterilmesini de sağlamaktadır ([Rosenberg, 1998](#)).

Sucul mollusklar, taban omurgasızları içerisinde ekolojik ve biyolojik izleme çalışmalarında, hemen hemen tüm sucul ortamlarda bulunabilmeleri, yüksek çeşitliliğe sahip olmaları ve kirleticilere karşı az ya da çok tepki göstermesi ile öne çıkan bir canlı grubudur ([Goldberg, 1986](#); [Salanki, 1989](#)). Bazı taksonomik gruplar (familya seviyesinde) sınırlı tolerans gösterse de, bazıları geniş toleransa sahiptir ([Yıldırım, 1999](#); [Mandaville, 2002](#)). Bu nedenle sıklıkla pasif ve aktif biyolojik izleme ve risk değerlendirme çalışmalarında kullanılmaktadır ([Borcherding ve Volpers, 1994](#)).

Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde doğrudan veya artılarak sucul ortamlara salınan evsel ve endüstriyel atıklar giderek artmakta olan bir problemdir ([Demirbaş, 2001](#)). Buna bağlı olarak, endüstrileşme ve hızlı nüfus artışı, özellikle son yıllarda önemli bir sorun haline gelmiştir ([Karşlıoğlu, Baba ve Ozan, 2004](#)). Ülkemiz su kaynaklarının korunması ve iyi ekolojik duruma getirilmesi çalışmaları, Avrupa Birliği'ne uyum programı ile hız kazanmış, bu bağlamda Su Çerçeve Direktifi (SÇD) (2000/60/AT) ülkemizde uygulamakta ve yüzey sularının fiziko-kimyasal ve biyolojik izleme programları yürütülmektedir ([Bulut ve Birben, 2019](#)). Biyolojik izleme programlarında en çok kullanılan ve SÇD kapsamında bir kalite unsuru olan taban büyük omurgasızları su kütlesi hakkında kapsamlı bir değerlendirme imkânı sunmaktadır ([Karr, 1999](#); [Kenney, Sutton-Grier, Smith, ve Gresens, 2009](#); [Kazancı vd., 2010](#)). Taban omurgasızları içinde önemli bir yeri olan tatlısu molluskları hakkında ülkemizde yapılan ilk çalışmalar [Roth \(1839\)](#) ile başlamış, müteakiben yerli ve yabancı çok sayıda bilimsel çalışmayla ([Schütt, 1964](#); [Schütt ve Bilgin, 1970](#); [Bilgin, 1980](#); [Schütt ve Şeşen, 1993](#); [Yıldırım, 1999](#); [Ustaoglu, Balık ve Özbek, 2001, 2003](#); [Öktener, 2004](#); [Yıldırım vd., 2006](#); [Kebapçı ve Yıldırım, 2010](#); [Kılıçaslan ve Özbek, 2010](#); [Koşal-Şahin, Bahadır-Koca ve Yıldırım, 2012](#); [Odabaşı ve Georgiev, 2014](#); [Yıldırım, Kebapçı, Koca ve Yüce, 2015](#); [Koşal-Şahin ve Zeybek, 2016](#); [Gürlek, 2017](#); [Gürlek, Koşal-Şahin, Dökümcü ve Yıldırım, 2019](#); [Gözler ve Baytaşoğlu, 2020](#); [Tomilova vd., 2020](#); [Odabaşı, Akay ve Koyuncuoğlu, 2020](#); [Sands vd., 2020](#)) hız kazanmıştır.

Marmara bölgesinin önemli bir bölümünü temsil eden Çanakkale İlinin kapladığı alandaki sucul ekosistemlerde oldukça sınırlı sayıda ekolojik çalışma mevcuttur. Diğer taraftan Gelibolu Yarımadası (Çanakkale) sınırlı Tatlısu kaynaklarının varlığı ile dikkat çeken bölgelerden birisidir. Biga Yarımadası içsu havzalarında bazı faunistik ([Bilgin, 1980](#); [Sarı, Balık, Ustaoglu ve Ilhan, 2006](#); [Odabaşı, Kebapçı ve Akbulut, 2013](#); [Odabaşı ve Georgiev, 2014](#); [Odabaşı, Arslan, Özdilek ve Odabaşı, 2019](#)) ve ekolojik ([Akbulut vd., 2009a](#); [Akbulut vd., 2009b](#); [Odabaşı ve Büyükates, 2009](#)) konuları ele alan bilimsel çalışmaların varlığı görülse de, Çanakkale'nin Avrupa kısmındaki en önemli doğal sucul ekosistemi olan Kavak Çayı'nda çok az çalışma mevcut olup ([Kelkit ve Öztürk, 2005](#); [Akbulut, Odabaşı, Odabaşı ve Çelik, 2006](#)), sucul omurgasızları hakkında hiç bilimsel veri bulunmamaktadır.

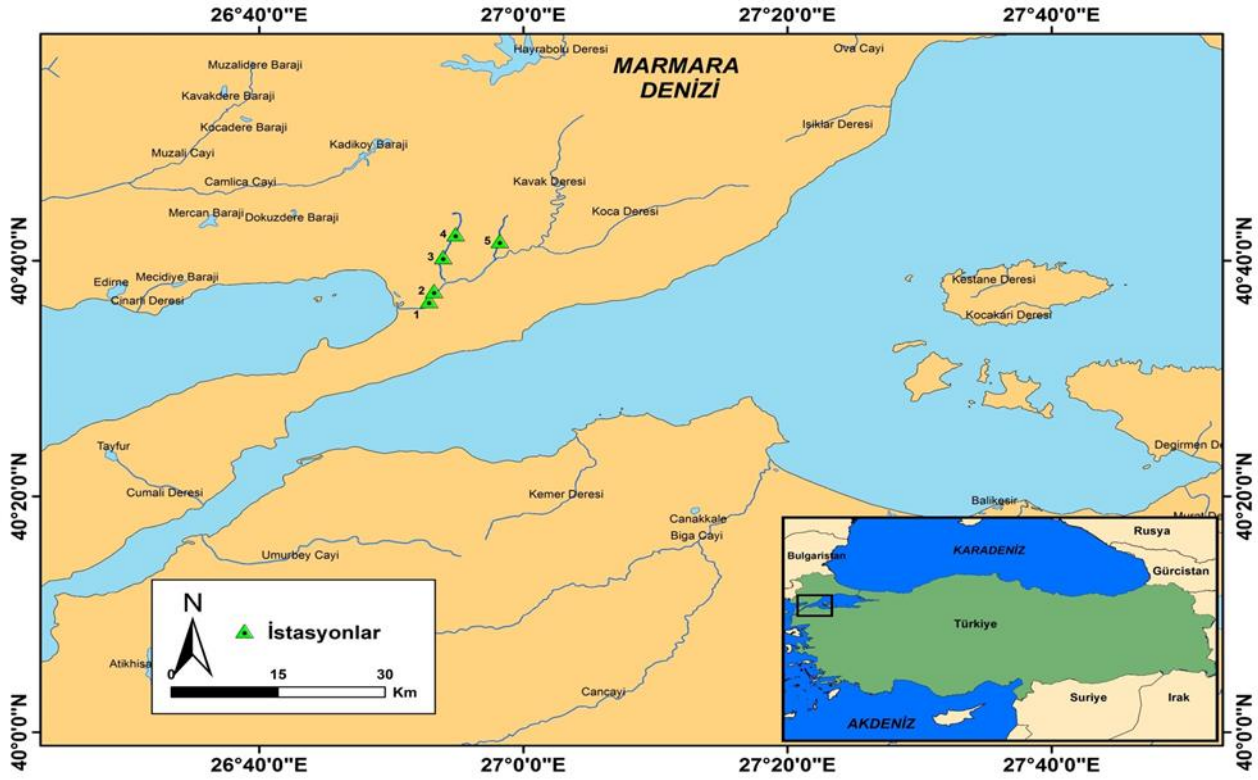
Kavak Çayı ve havzasının bazı kollarında gerçekleştirilen bu çalışmada, sucul molluska tür çeşitliliği ile bazı su kalitesi parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma alanını oluşturan bölgede bu konu ile ilgili bir bilimsel çalışma bulunmamasından dolayı ilk olma özelliği taşıyan bu araştırma, bölgenin ve ülkemizin zoocoğrafik bilgi birikimine katkı sunabilecek niteliktedir.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Örneklem Bölgesi

Marmara bölgesinin Trakya bölümünde ve Çanakkale ili ile Tekirdağ ili arasında yer alan Kavak Çayı, çalışma alanını oluşturmaktadır. 50 km uzunluğundaki Kavak Çayı Gelibolu Yarımadasını geçip Saroz körfezi' ne dökülür. Korudağı' ndan doğan Kavak Çayı, 1100 m<sup>3</sup>/sn'lik bir su debisine sahiptir ([Anonim, 2013](#)). Havzayı etkileyen başlıca kirleticilerin evsel atıklar, evsel katı atıklar, zirai ilaç ve gübre kullanımlarının olduğu belirtilmektedir. Kavak Çayı Deltası, 2010 yılında Özel Çevre Koruma Alanı olarak kabul edilmiştir, bunun yanı sıra birinci derece doğal sit alanıdır. Ülkemizdeki önemli 135 sulak alan içinde kalmaktadır ([Anonim, 2013](#)).

Bu çalışmanın amacına yönelik olarak, Kavak Çayı havzasında 5 farklı örneklem istasyonu seçilmiştir. Kavak deltasına yakın bir konumda bulunan birinci örneklem istasyonu Kavakköy yakınından belirlenmiştir. Birinci istasyona yakın konumdaki Kavakköy köprüsü, ikinci örneklem istasyonu seçilmiştir. Evreşe Beldesinin yakınındaki alandan seçilen bölge, çalışmanın üçüncü örneklem istasyonudur. Dördüncü örneklem istasyonu, Bayramiç Beldesi yakınından belirlenmiştir. Yülüce Köyü yakınından belirlenen örneklem alanı ise bu çalışmanın beşinci ve son istasyonudur ([Şekil 1, Tablo 1](#)).



Şekil 1. Çalışma bölgesinde seçilen örneklem noktaları

Tablo 1

Çalışma alanında seçilen istasyonların koordinatları ve örnekleme tarihleri

İstasyonlar	Örnekleme zamanları	Koordinat
<b>KV1</b>	29.01.2016, 24.05.2016, 31.08.2016, 03.11.2016	40° 37' 23'' N / 26° 53' 9'' E
<b>KV2*</b>	24.05.2016, 03.11.2016	40° 36' 49'' N/ 26° 53' 0'' E
<b>KV3*</b>	29.01.2016, 24.05.2016	40° 40' 12'' N/ 26° 53' 32'' E
<b>KV4</b>	29.01.2016, 24.05.2016, 31.08.2016, 03.11.2016	40° 42' 3'' N/ 26° 54' 17'' E
<b>KV5**</b>	29.01.2016, 24.05.2016	40° 41' 39'' N/ 26° 58' 9'' E

\*Akarsu yatağı çevresindeki alt yapı çalışmaları nedeniyle her dönem örnekleme yapılmamıştır

\*\*Örnekleme noktasında su akışı olmadığı dönemlerde örnekleme yapılmamıştır

## 2.2. Bentos Örnekleme ve Tür Teşhisleri

Molluska tür çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla akarsu tabanı çoklu habitat yöntemi (BS EN 16150:2012) ile örneklendirilmiştir. Yöntem, her bir akarsu içi habitatın (Kumlu, Çamurlu, Bitkili, Detritus) akarsu boyunca 20 m mesafe içindeki kapladığı alanın büyüklüğüne göre el kepçesi (25 cm taban uzunluğu ve 500 µ ağ göz açıklığı) ile örneklendirilmiştir. Bununla birlikte örnekleme alanında bulunan taş ve bitkilik habitatlar incelenmiş, bulunan farklı türdeki örnekler pens, fırça gibi aletler yardımıyla örneklere dahil edilmiştir. Örneklerin fiksasyon için %80'lik etil alkol kullanılmıştır. Laboratuvara getirilen bentik örnekler organizma gruplarına ayrılmıştır. Gruplara ayrılan organizmalar Stereo zoom (Olympus SD30) mikroskop kullanılarak teşhis edilmiştir. Teşhisler [Glöer \(2015\)](#), [Killeen, Aldridge, Oliver ve Council \(2004\)](#), [Bilgin \(1980\)](#), [Kornuışin \(1996\)](#), [Schütt \(1965\)](#), [Öztürk, Önen ve Doğan \(2008\)](#) ve [Lopes-Lima vd. \(2021\)](#)'e göre yapılmıştır. Türlerin fotoğraflanması ve ölçeklendirilmesinde Zeiss Stemi 508 ile bütünleşik AxioCam 105 color cihazı kullanılmıştır.

## 2.3. Suyun Fiziksel ve Kimyasal Değişkenleri

Bentik örnekleme yapılan örnekleme istasyonlarında suyun pH, çözünmüş oksijen, TDS (toplam çözünmüş katılar) parametreleri çoklu parametre ölçer (HI 98194, pH/EC/DO multiparameter) ile yerinde kaydedilmiştir. Ayrıca 500 mL'lik polietilen örnekleme kaplarına alınan su örnekleri de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub>, B, Ni, Co, Zn, Fe, Al, Ba, Mn, Cr, Cu, Pb, Cd ve Na<sup>+</sup> K, Ca iyonlarının analizleri için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Merkez Laboratuvarına soğuk zincirde transfer edilmiştir. Su parametreleri Su Kalitesi Kriterleri yönetmeliği ([Anonim, 2004](#)) ile karşılaştırılıp değerlendirilmiştir.

## 2.4. Veri Analizi

Teşhis edilen tatlısu molluskları istasyonlardaki bulunuşlarına göre baskınlık ve sıklık değerleri PAST (4.05) paket programı ile hesaplanmıştır. Su kalitesi parametrelerinin istasyonlardaki değerlerinin mevsim ortalamaları ve standart sapma değerleri belirlenmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

Çalışma boyunca gerçekleştirilen örnekleme yapılarında teşhis edilen toplam takson sayısı 17'dir. Gastropoda sınıfına ait *Bithynia tentaculata*, *Bithynia* sp., *Ecrobia ventrosa*, *Bittium reticulatum*, *Valvata piscinalis* ve *Rissoa* sp., *Galba truncatula*, *Gyraulus piscinarum*, *Planorbis carinatus*, *P. intermixtus*, *Physella acuta*, *Radix labiata* olmak üzere toplam 12 takson teşhis edilmiştir. Bivalvia sınıfından ise *Pisidium nitidum*, *Musculium lacustre*, *Pisidium* sp. ve *Abra* sp. ile *Unio eucirrus* olmak üzere 5 taksonun varlığı belirlenmiştir ([Tablo 2](#)).

Tablo 2

Teşhis edilen sucul mollusklar ve buldukları örnekleme istasyonları

Türler / İstasyonlar	KV1	KV2	KV3	KV4	KV5
<b>Gastropoda/ Caenogastropoda</b>					
<i>Bithynia tentaculata</i>	+	-	+	-	-
<i>Bithynia</i> sp.	+	-	-	-	-
<i>Valvata piscinalis</i>	+	-	-	-	-
<i>Bittium reticulatum</i>	+	-	+	-	-
<i>Ecrobia ventrosa</i>	+	-	-	-	-
<i>Rissoa</i> sp.	+	-	+	-	-
<b>Gastropoda/Heterobranchia</b>					
<i>Galba truncatula</i>	+	+	+	-	-
<i>Gyraulus piscinarum</i>	+	-	-	-	-
<i>Physella acuta</i>	+	-	-	-	-
<i>Planorbis carinatus</i>	-	-	+	-	-
<i>Planorbis intermixtus</i>	+	-	-	-	-
<i>Radix labiata</i>	+	-	-	-	-
<b>Bivalvia</b>					
<i>Musculium lacustre</i>	-	-	-	-	+
<i>Pisidium nitidum</i>	-	-	+	-	-
<i>Pisidium</i> sp.	+	-	+	-	-
<i>Abra</i> sp.	+	-	-	-	-
<i>Unio eucirrus</i>	+	-	-	-	-

Çalışma boyunca tespit edilen türlerden birey sayısı olarak en bol türlerin %19.84 baskınlık değeri ile *Galba truncatula* ile *Valvata piscinalis* olduğu belirlenmiştir (Tablo 3). Sayıca fazla olan bu gastropodlardan *V. piscinalis*' in İstasyon I ve İstasyon IV'ten örneklendiği belirlenmiştir. *G. truncatula*'nın ise sırasıyla en fazla istasyon IV ve istasyon III'ten örneklendiği görülmüştür (Tablo 3). Birey sayısı yüksek olan gastropodlar ile birlikte, *V. piscinalis*, *Pisidium* sp. ve *Physella acuta* %22.22 frekans değeri ile çalışma boyunca en sık rastlanılan taksonlardır (Tablo 3). Bivalvia grubuna ait taksonlardan sayıca en bol olanının %19.05 dominans oranı ile *Pisidium nitidum*'un öne çıktığı görülmektedir. Bu türün en fazla birey sayısı İstasyon IV istasyonunda tespit edilmiştir. Akbulut vd. (2009a)'a göre Atikhisar Barajı ve Sarıçay (Çanakkale)'da yapılan çalışmada Molluska faunasına ait toplam 29 takson tespit edilmiştir. Atikhisar Barajı ve Sarıçay'da gerçekleştirilen bu çalışmada *Physella acuta* türünün %11.76 baskınlık ve %15.63 frekans değeri ile en baskın ve en sık rastlanan gastropod olduğu ortaya konulmuştur. *Physella acuta* Kavak Çayı'nda düşük birey sayısı ile temsil edilmesine rağmen frekansı en yüksek türdür. İki çalışma arasında tür çeşitliliği bakımından benzerlik bulunsa da, Sarıçay ve Atikhisar Barajında daha yüksek bir tür çeşitliliği görülmektedir. Bu iki çalışma, bivalv taksonları bakımından karşılaştırıldığında, Kavak Çayı'nda *Pisidium nitidum* türünün, Sarıçay akarsuyu ve Atikhisar Barajında ise *Dreissena polymorpha* türünün baskınlık ve sıklık bakımından belirgin biçimde öne çıktıkları görülmektedir. *P. acuta* ve *D. polymorpha* istilacı canlılar arasında gösterilen, sırasıyla Kuzey Amerika kıtası ve Doğu Avrupa kökenli mollusklardır (Dillon, Wethington, Rhett ve Smith, 2005; Stanczykowska, Lewandowski ve Ejsmont-Karabin, 1983). Çanakkale İlindeki (Anadolu tarafındaki) akarsularda varlığı tespit edilen *D. polymorpha*, *Potamopyrgus antipodarum* ve *P. acuta* gibi bazı istilacı mollusk taksonlarının (Odabaşı, Arslan, Özdilek ve Odabaşı, 2019), sonuncusu hariç Kavak Çayı'nda var olmadığı görülmüştür.



Tablo 3

İstasyonlarda tespit edilen canlı türlerinin mevsimlere göre dağılımı

MEVSİM	İLKBAHAR					YAZ					SONBAHAR					KIŞ					Toplam birey	%D	F	%F
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5				
<b>Gastropoda/ Pulmonata</b>																								
<i>Galba truncatula</i>	0	0	0	27	0	4	0	0	10	0	1	0	0	0	0	0	0	8	0	0	50	19.84	5	27.78
<i>Gyraulus piscinarum</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.79	1	5.56
<i>Physella acuta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	7	2.78	4	22.22
<i>Planorbis carinatus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.4	1	5.56
<i>Planorbis intermixtus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.4	1	5.56
<i>Radix labiata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1.59	2	11.11
<b>Gastropoda/ Prosobranchia</b>																								
<i>Bithynia tentaculata</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2.78	3	16.67
<i>Bithynia sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1.98	1	5.56
<i>Valvata piscinalis</i>	0	0	0	0	0	3	0	2	10	0	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	19.84	4	22.22
<i>Bittium reticulatum</i>	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	14	0	0	0	0	37	14.66	3	16.67
<i>Ecrobia ventrosa</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2.78	2	11.11
<i>Rissoa sp.</i>	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	5.56	3	16.67
<b>Bivalvia</b>																								
<i>Musculium lacustre</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.4	2	11.11
<i>Pisidium nitidum</i>	0	0	0	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48	19.05	1	5.56
<i>Pisidium sp.</i>	0	0	0	2	0	5	0	0	0	0	9	0	0	2	0	0	0	0	0	0	18	7.14	4	22.22
<i>Abra sp.</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.4	1	5.56
<i>Unio eucirrus</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.79	1	5.56

*Galba truncatula*'nın yüksek pH (9.6' ya kadar) değerlerinde yaşayabildiği ve insan yerleşimlerine yakın lokalitelerde buldukları bildirilmiştir (Glöer, Yıldırım ve Kebapçı, 2015). Kavak Çayı'nda akarsu boyunca tarım ve hayvancılık faaliyetlerinin yaygın olması ve suyun pH değerlerinin (Tablo 4) bu türün bölgedeki dağılımını teşvik ettiği söylenebilir. Aynı zamanda, molluska faunasının Kavak Çayı'nda nispeten düşük çeşitlilik sergilemesinin yukarıda belirtilen çevresel kullanımlar ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Kavak Çayı'nda gerçekleştirilen bu çalışmada, teşhis edilen birçok gastropod ve bivalv türünün (*Bithynia* sp. *B. tentaculata*, *V. piscinalis*, *B. reticulatum*, *E. ventrosa*, *Rissoa* sp., *G. truncatula*, *G. piscinarum*, *P. acuta*, *P. carinatus*, *P. intermixtus*, *R. labiata*, *Pisidium* sp., *Abra* sp., *U. eucirrus*) I. istasyonda bir arada buldukları görülmektedir (Tablo 2). Ölçülen su kalite parametresi bakımından SKKY'ne göre I. ve IV sınıf yüzey suyu özelliği taşıyan bu istasyonda organik kirliliğe orta derecede toleranslı taksonların bulunması (Kerney, 1999; Çabuk, Arslan ve Yılmaz, 2005; Seddon, Kebapçı ve Van Damme, 2014), bu istasyonun mollusk taksonlarının tercih ettikleri habitatları da bulundurmasıyla açıklanabilir. Çalışmanın birinci istasyonu nehir ağzı ekosistemine yakın olduğundan, tipik bir acı su türü olan *E. ventrosa* (Kerney, 1999) ve *B. reticulatum*, *Rissoa* sp., *Abra* sp. gibi bazı denizel taksonların bu ortamda diğer tatlısu molluskaları ile düşük sayıda da olsa birlikte bulunmaları olağan bir durumdur. Küresel bir istilacı olan ve Kuzey Amerika kökenli *P. acuta* (Dillon, Wethington, Rhett ve Smith, 2005; Semenchenko, Laenko ve Razlutski, 2008; Odabaşı, Arslan, Özdilek ve Odabaşı, 2019), bu çalışmada *G. truncatula*'dan sonra en sık rastlanılan ikinci tür olduğu tespit edilmiştir. Akbulut vd. (2009a)'un bulgularına göre ise *P. acuta* Sarıçay ve Atikhisar Barajında en bol ve sık bulunan türdür.

Tablo 4

Örnekleme İstasyonlarındaki Bazı Su Kalitesi Parametreleri ortalama değerleri, standart sapmaları ( $\pm$ ) ve su kalitesi sınıfları

Parametreler	KV1	KV2	KV3	KV4	KV5
pH	7.06 $\pm$ 1.39	7.01 $\pm$ 1.82	8.47 $\pm$ 0.26	7.71 $\pm$ 1.44	8.39 $\pm$ 0.26
Kalite Sınıfı	I	I	I	I	I
E.İ (µS/cm)	111.5	1468	1198	3278	3278
Sıcaklık	13.39 $\pm$ 10.62	16.86 $\pm$ 4.15	15.35 $\pm$ 9.63	14.73 $\pm$ 5.87	16.95 $\pm$ 9.65
Kalite Sınıfı	I	I	I	I	I
ÇO (%)	87.37 $\pm$ 41.47	63.65 $\pm$ 20.17	58.65 $\pm$ 16.19	53.9 $\pm$ 15.07	51.2 $\pm$ 14.14
Kalite Sınıfı	II	III	III	III	III
ÇO (mg/L)	6.88 $\pm$ 1.87	8.29 $\pm$ 1.46	5.91 $\pm$ 0.37	5.37 $\pm$ 1.29	4.9 $\pm$ 0.34
Kalite Sınıfı	II	I	III	III	III
TDS (mg/L)	306.69 $\pm$ 407.22	443.77 $\pm$ 574.49	758 $\pm$ 118.8	835 $\pm$ 176.74	555 $\pm$ 72.13
Kalite Sınıfı	I	I	II	II	II
Cl <sup>-</sup> (mg/L)	21.43	-	-	18.97	-
Kalite Sınıfı	I	-	-	I	-
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	43.3	-	-	36.15	-
Kalite Sınıfı	I	-	-	I	-
NO <sub>3</sub> (mg/L)	3.42	-	-	13.21	-
Kalite Sınıfı	I	-	-	III	-
Na <sup>+</sup> (mg/L)	12.7 $\pm$ 10.03	5.87 $\pm$ 1.42	14.53 $\pm$ 15.14	3.42 $\pm$ 1.75	13.42 $\pm$ 13.59
Kalite Sınıfı	I	I	I	I	I

Tablo 4 (Devamı)

Parametreler	KV1	KV2	KV3	KV4	KV5
<b>Cd (µg/L)</b>	0.31		0.19	1.37 ± 2.75	
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	-	I	I	-
<b>Pb (µg/L)</b>	11.29 ± 7.56	8.6	6.72 ± 5.18	9.3 ± 3.74	1.53 ± 2.16
<b>Kalite Sınıfı</b>	II	I	I	I	I
<b>Cu (µg/L)</b>	3.04 ± 1.52	1.95 ± 1.43	2.11 ± 2.9	1.79 ± 1.33	3.03 ± 1.6
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	I
<b>Cr (µg/L)</b>	0.8 ± 0.36	0.11	0.3	0.41	0.53
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	I
<b>Mn (µg/L)</b>	142.68 ± 211.08	4.08 ± 1.63	9.53 ± 5.11	9.21 ± 2.97	5.91 ± 0.007
<b>Kalite Sınıfı</b>	III	I	I	I	I
<b>Ba (µg/L)</b>	68.5 ± 37.38	34.26 ± 3.82	44.38 ± 16.56	64.52 ± 33.52	32.97 ± 0.42
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	I
<b>Al (mg/L)</b>	41.47 ± 40.9	51.01 ± 52.19	55.29 ± 45.72	40.75 ± 32.47	18.25 ± 1.66
<b>Kalite Sınıfı</b>	IV	IV	IV	IV	IV
<b>Fe (µg/L)</b>	31.45	13.33	2.45	21.89	9.13
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	I
<b>Co (mg/L)</b>	1.17 ± 0.35	0.96 ± 0.43	0.99 ± 0.81	0.6 ± 0.41	0.35 ± 0.09
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	I
<b>Zn (µg/L)</b>	6.38 ± 8.23	2.91	0.45	3.47	ALA
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	ALA
<b>Ni (mg/L)</b>	4.75 ± 5.26	4.1	0.62	0.87 ± 1.38	ALA
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	ALA
<b>Mg (mg/L)</b>				2.60 ± 1.49	2.68 ± 0.12
<b>Kalite Sınıfı</b>	-	-	-	I	I
<b>B (mg/L)</b>				79.28 ± 33.17	35.97 ± 12.33
<b>Kalite Sınıfı</b>	-	-	-	I	I
<b>Ca(mg/L)</b>	1.17 ± 0.18	0.96 ± 0.23	0.99 ± 0.46	0.6 ± 0.03	0.35 ± 0.11
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	I
<b>K (mg/L)</b>	8.11 ± 2.24	5.6 ± 0.9	5.52 ± 3.42	2.11	2.77
<b>Kalite Sınıfı</b>	I	I	I	I	I

ALA: Analiz Limiti Altında

Elde edilen verilere göre, Kavak Çayı'ndaki birey sayısı bakımından en bol bulunan bivalv türü *Pisidium nitidum*'dur. [Kuiper vd. \(1989\)](#)'a göre Kuzey Avrupa'da daha yaygın olan *P. nitidum*, soğuk sulara toleranslı bir türdür. ([Akbulut vd., 2009a](#)) tarafından Çanakkale ili iç sularından varlığı bildirilen bu türün, Türkiye'deki diğer havzalardan varlığı bilinmemektedir.

Kavak çayında belirlenen örnekleme istasyonlarındaki taksonların tolerans değerlerinin Hilsenhoff ölçeğine göre ([Mandaville, 2002](#)) genelde yüksek toleranslı ve toleranslı kategorisinde yer aldıkları görülmektedir ([Tablo 5](#)). Bu bakımdan bu çalışmadaki örnekleme istasyonlarının organik kirleticilerin baskısı altında olduğu söylenebilir. Yerinde ve laboratuvarında ölçülen su kalitesi parametrelerinden ÇO yoğunluk ve yüzde doygunluğu, NO<sub>3</sub> ve Al değerlerinin SKKY'ne göre çoğunlukla III. ve IV. sınıf su kalitesi özelliği sergilemiştir ([Tablo 4](#)). Bu durumun bölgedeki tarımsal faaliyetlerin yoğunluğundan ve yerleşim yerlerindeki alt yapı

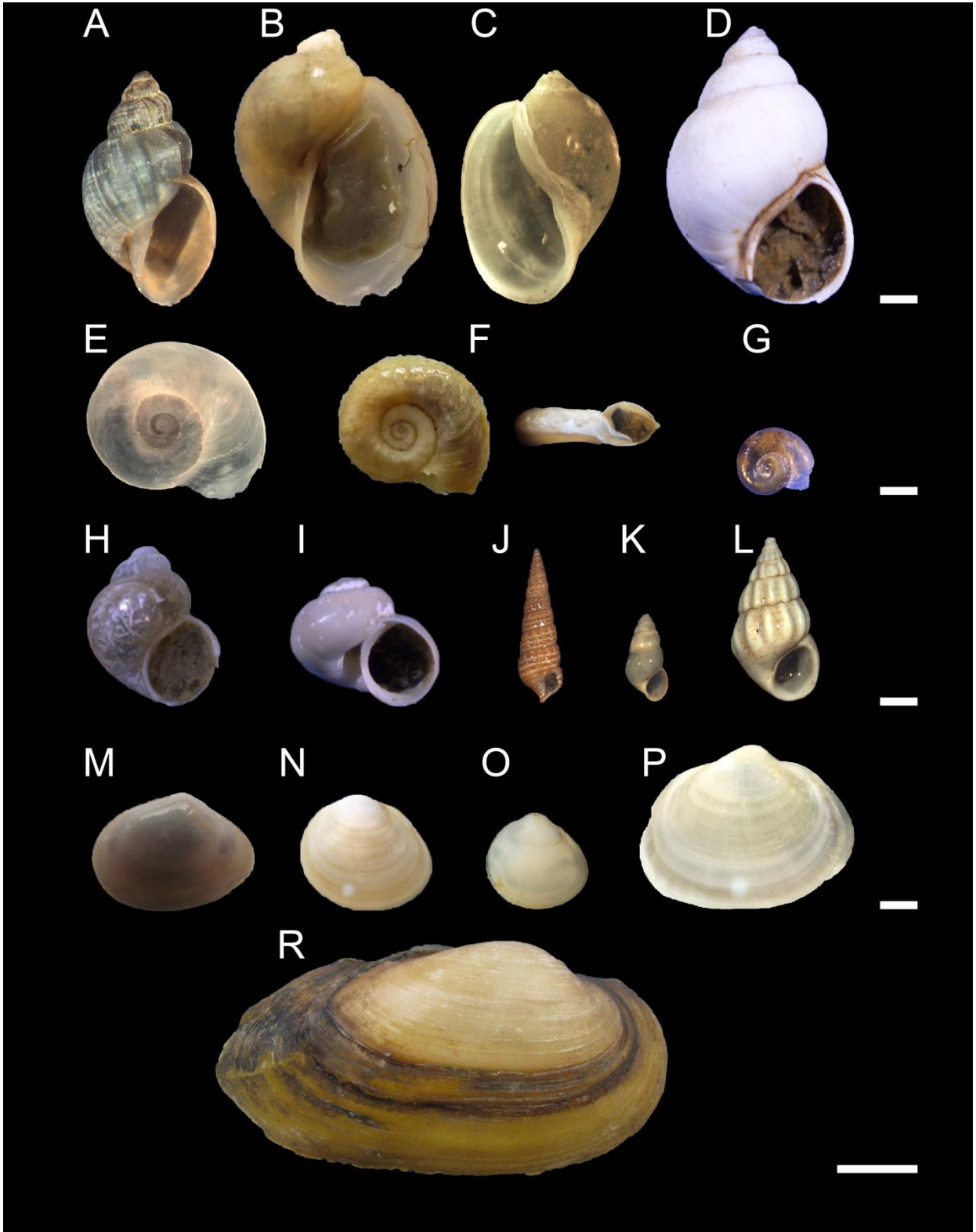
eksikliğinden (Anonim, 2013: 35) kaynaklandığı öngörülmektedir. Alüminyum elementinin sudaki birincil kaynağı toprak ve kayalar (Miller, Kopfler, Kelty, Stober ve Ulmer, 1984), bu bağlamda, Kavak Çayının üst havzasında deva eden baraj inşaatının (Çokal Barajı) alüminyum değerlerini yükselttiği düşünülebilir.

Tablo 5

Teşhis edilen Molluska taksonlara ait Hilsenhoff biotik indeksine göre taksa tolerans değerleri

Taksonlar	Tolerans Değeri	İndikatör/ Su kalitesi*	Taksonlar	Tolerans Değeri	İndikatör/ Su kalitesi*	Taksonlar	Tolerans Değeri	İndikatör/ Su kalitesi*
<i>G. truncatula</i>	6	T/O	<i>B. tentaculata</i>	8	YT/S	<i>M. lacustre</i>	6	T/O
<i>G. piscinarum</i>	8	YT/S	<i>Bithynia</i> sp.	8	YT/S	<i>P. nitidum</i>	8	YT/S
<i>P. acuta</i>	8	YT/S	<i>V. piscinalis</i>	8	YT/S	<i>Pisidium</i> sp.	6	T/O
<i>P. carinatus</i>	6	T/O	<i>B. reticulatum</i>	yok		<i>Abra</i> sp.	yok	
<i>P. intermixtus</i>	6	T/O	<i>E. ventrosa</i>	yok		<i>U. eucirrus</i>	6	T/O
<i>R. labiata</i>	6	T/O	<i>Rissoa</i> sp.	yok				

\*: T (toleranslı), YT (yüksek toleranslı), O (orta; organik kirlilik mevcut), S (sağlıksız; belirgin organik kirlilik mevcut)



Şekil 2. Çalışma alanından teşhis edilen taksonlar. A: *Galba truncatula*, B: *Radix labiata*, C: *Physella acuta*, D: *Bithynia tentaculata*, E: *Planorbis intermixtus*, F: *Planorbis carinatus*, G: *Gyraulus piscinarum*, H: *Bithynia* sp., I: *Valvata piscinalis*, J: *Bittium reticulatum*, K: *Ecrobia ventrosa*, L: *Rissoa* sp., M: *Abra* sp., N: *Pisidium nitidum*, O: *Pisidium* sp., P: *Musculium lacustre*, R: *Unio eucirrus* (Ölçek Barı A-P: 1 mm, R: 1 cm)



#### 4. Sonuçlar

Coğrafi olarak Trakya bölgesinde yer alan ve Marmara Havzasının bir akarsu ekosistemi olan Kavak Çayı'nda gerçekleştirilen bu çalışmada teşhis edilen mollusk faunası taksonları çalışma bölgesinde ilk kez bildirilmiştir. Teşhis edilen taksonların genel olarak toleranslı ve yüksek toleranslı oldukları belirlenmiştir. Buna rağmen istilacı özellik sergileyen mollusk taksonlarının bulunmayışı, ya da düşük birey sayısı ile temsil edilmesi (*P. acuta* gibi) önemli bir dağılım ve popülasyon yapısı bulgusu olarak değerlendirilmiştir. Çevresel arazi kullanımı bakımından, Kavak Çayı tarım alanlarının ve bazı yerleşim alanlarının etkisi altındadır. Bu durum, bazı su kalitesi verilerine yansıdığı gibi, ağırlıklı olarak ekolojik toleransı yüksek molluskların varlığı ile de kendini göstermiştir. Tatlısu habitatlarının sucül ekosistem içerisinde en fazla baskı altındaki habitatlar oldukları belirtilmektedir (Angelier, 2002; Mason, 2002). Çalışma alanımızda elde edilen veriler dikkate alındığında, Kavak Çayı'nda nitrat, alüminyum ve çözülmüş oksijen gibi bazı su kalitesi parametrelerinin su kalite sınıfını düşürdüğü ve tespit edilen mollusk taksonlarının genelde toleranslı özellikte olduğu görülmektedir. Gerekli tedbirlerin alınmasıyla su kalitesinde ve sucül organizma komünitesinde olumlu gelişmeler kaydedilmesi öngörülmektedir.

#### Teşekkür

Bu Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, BAP birimince FYL-2015-676 kodu ile finanse edilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın son haline gelmesinde katkılarını sunan hakemlere, özellikle *Unio eucirrus*'un teşhisinde yardımcı olan hakeme çok teşekkür ederiz.

#### Yazar Katkıları

Demet Bal: Saha örnekleme, Laboratuvar uygulama ve analizleri konularında katkı sağlamıştır.

Deniz Anıl Odabaşı: Projenin yürütülmesi, Metodoloji seçimi ve uygulanması ve Taslak metnin yazımı konularında katkı sağlamıştır.

Aytuğ Zilifli: Çalışmanın istatistiksel analizlerini yapmış, taslak metin yazımında katkı sağlamıştır.

#### Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

#### Kaynaklar

- Akbulut, M., Çelik, E. Ş., Odabaşı, D. A., Kaya, H., Selvi, K., Arslan, N. ve Sağır-Odabaşı, S. (2009b). Seasonal distribution and composition of benthic macroinvertebrate communities in Menderes Creek, Çanakkale, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(11a), 2136–2145. Erişim adresi: [https://www.researchgate.net/profile/Kahraman-Selvi/publication/259384032\\_Seasonal\\_distribution\\_and\\_composition\\_of\\_benthic\\_macroinvertebrate\\_communities\\_in\\_menderes\\_creek\\_Canakkale\\_TURKEY/links/0c96052ba1e9bbec4a000000/Seasonal-distribution-and-composition-of-benthic-macroinvertebrate-communities-in-menderes-creek-Canakkale-TURKEY.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Kahraman-Selvi/publication/259384032_Seasonal_distribution_and_composition_of_benthic_macroinvertebrate_communities_in_menderes_creek_Canakkale_TURKEY/links/0c96052ba1e9bbec4a000000/Seasonal-distribution-and-composition-of-benthic-macroinvertebrate-communities-in-menderes-creek-Canakkale-TURKEY.pdf)
- Akbulut, M., Odabaşı, D. A., Kaya, H., Çelik, E. Ş., Yıldırım, M. Z., Odabaşı, S. S. ve Selvi, K. (2009a). Changing of Mollusca Fauna In Comparison With Water Quality: Sariçay Creek and Atikhisar Reservoir Models (Çanakkale-Turkey), *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8(12): 2699–2707. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/259384114>
- Akbulut, M., Odabaşı, S. S., Odabaşı, D. A. ve Çelik, E. Ş. (2006). Çanakkale İli'nin Önemli İçsuları ve Kirlenici Kaynakları. *Su Ürünleri Dergisi*, 23(1), 9–15. Erişim adresi: <http://www.egejfas.org/en/download/article-file/57667>
- Angelier, E. (2002). *Ecologia de las aguas corrientes*. Madrid: Acribia. Erişim adresi: [https://www.editorialacribia.com/libro/ecologia-de-las-aguas-corrientes\\_54170/](https://www.editorialacribia.com/libro/ecologia-de-las-aguas-corrientes_54170/)
- Anonim. (2004). *Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği*. Resmi Gazete Tarihi 31.12.2004. Resmi Gazete

- Sayısı.25687. Erişim adresi: <http://www.dogacevre.com.tr/files/pdf/81.pdf>
- Anonim. (2013). *Çanakkale İl Çevre Durumu Rapor 2012: Çanakkale İl Çevre ve Şehircilik Md..* Erişim Adresi: [https://webdosya.csb.gov.tr/db/ced/eduardosya/Canakkale\\_icdr2013.pdf](https://webdosya.csb.gov.tr/db/ced/eduardosya/Canakkale_icdr2013.pdf)
- Bilgin, F. H. (1980). Batı Anadolu'nun Bazı Önemli Tatlı Sularından Toplanan Mollusca Türlerinin Sitematiği ve Dağılışı. *Diyarbakır Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 8(2): 1–64.
- Borcherding, J. ve Volpers, M. (1994). The “*Dreissena*-Monitor” first results on the application of the biological early warning system in the continuous monitoring of water quality. *Water Science and Technology*, 29(3), 199–201. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0099>
- Bulut, M. ve Birben, Ü. (2019). AB Su Çerçeve Direktifinin Türkiye’de su kaynakları yönetimine etkisi. *Türkiye Ormanlık Dergisi*, 20(3), 221–233. <https://doi.org/10.18182/tjf.562550>
- Çabuk, Y., Arslan, N. ve Yılmaz, V. (2005). Species Composition and Seasonal Variations of the Gastropoda in Upper Sakarya River System (Turkey) in Relation to Water Quality. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 6(32), 393–400. <https://doi.org/10.1002/aheh.200300544>
- Demirbaş, A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 42(11), 1357–1378. [https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(00)00137-0)
- Dillon, R. T., Wethington, A. M., Rhett, J. M. ve Smith, T. P. (2005). Populations of the European freshwater pulmonate *Physella acuta* are not reproductively isolated from America *Physella heterostropha* or *Physella integra*. *Invertebrate Biology*, 3(121), 226–234. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2002.tb00062.x>
- Glöer, P. (2015). Süßwassermollusken-Ein Bestimmungsschlüssel für die Muscheln und Schnecken im Süßwasser der Bundesrepublik Deutschland. Göttingen, Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung.
- Glöer, P., Yıldırım, M. Z. ve Kebapçı, Ü. (2015). Description of two new species of *Pseudamnicola* from southern Turkey (Mollusca: Gastropoda: Hydrobiidae). *Zoology in the Middle East*, 2(61), 1–5. <https://doi.org/10.1080/09397140.2015.1008189>
- Goldberg, E. G. (1986). The mussel watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment*, 7, 91–103. <https://doi.org/10.1007/BF00398031>
- Gözler, A. M. ve Baytaşoğlu, H. (2020). Mollusca Fauna of the Çoruh River and Its Tributaries. *Journal of Anatolian Environmental And Animal Sciences*, 5(2), 185–190. <https://doi.org/10.1080/09397140.2015.1008189>
- Gürlek, M. E. (2017). Three new truncatelloidean gastropod species from Turkey (Caenogastropoda: Littorinimorpha). *Turkish Journal of Zoology*, 41(6), 991–997. <https://doi.org/10.3906/zoo-1701-37>
- Gürlek, M. E., Koşal-Şahin, S., Dökümcü, N. ve Yıldırım, M. Z. (2019). Checklist of the freshwater mollusca of Turkey (Mollusca: Gastropoda, Bivalvia). *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(4), 2992–3013. Erişim adresi: [https://www.researchgate.net/profile/Mustafa-Guerlek/publication/332422818\\_CHECKLIST\\_OF\\_THE\\_FRESHWATER\\_MOLLUSCA\\_OF\\_TURKEY\\_MOLLUSCA\\_GASTROPODA\\_BIVALVIA/links/5cb482c192851c8d22eca5a0/CHECKLIST-OF-THE-FRESHWATER-MOLLUSCA-OF-TURKEY-MOLLUSCA-GASTROPODA-BIVALVIA.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mustafa-Guerlek/publication/332422818_CHECKLIST_OF_THE_FRESHWATER_MOLLUSCA_OF_TURKEY_MOLLUSCA_GASTROPODA_BIVALVIA/links/5cb482c192851c8d22eca5a0/CHECKLIST-OF-THE-FRESHWATER-MOLLUSCA-OF-TURKEY-MOLLUSCA-GASTROPODA-BIVALVIA.pdf)
- Hering, D., Johnson, R. K., Kramm, S., Schmutz, S., Szoszkiewicz, K. ve Verdonschot, P. F. M. (2006). Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and fish: a comparative metric-based analysis of organism response to stress. *Freshwater Biology* 51(9), 1757–1785. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01610.x>
- Karr, J. R. (1999). Defining and measuring river health. *Freshwater Biology*, 41(2), 221–234. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00427.x>
- Karlıoğlu, E., Baba A. ve Deniz, O. (2004). Environmental Problems of Çanakkale Province. *Proceeding of 5th National Ecology and Environment Congress* (pp 513–538). Bolu, Turkey.
- Kazancı, N., Türkmen, G., Ertunç, Ö., Ekingen, P., Öz, B. ve Gültutan, Y. (2010). Assessment of ecological quality of Yeşilirmak River (Turkey) by using macroinvertebrate-based methods in the content of Water Framework Directive. *Review of Hydrobiology*, 3(2), 89–110. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/235933586>
- Kebapçı, Ü. ve Yıldırım, M. Z. (2010). Freshwater snails fauna of the lakes region (Göller Bölgesi), Turkey. *Oltenia Studii și comunicări. Științele Naturii*, 26(2): 75–83. Erişim adresi: [http://biozoojournals.ro/oscsn/cont/26\\_2/IZ02.Kebaci.pdf](http://biozoojournals.ro/oscsn/cont/26_2/IZ02.Kebaci.pdf)
- Kelkit, A. ve Öztürk, C. (2005) Kavak Deltası (Çanakkale)’nin Korunan Alanlar Açısından İncelenmesi. *Korunan Doğal Alanlar Sempozyumu* (pp. 233–236). Isparta, Türkiye. Erişim adresi:

- <http://ormanweb.isparta.edu.tr/kdas/belgeler/posterbildiriler/56.pdf>
- Kenney, M. A., Sutton-Grier, A. E., Smith, R. F. ve Gresens, S. E. (2009). Benthic macroinvertebrates as indicators of water quality: The intersection of science and policy. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 2(2), 99. <https://doi.org/10.1163/187498209X12525675906077>
- Kerney, M. (1999). *Atlas of the land and Freshwater molluscs of Britain and Ireland*. Colchester, England: Harley Books. Erişim Adresi: <https://brill.com/view/title/23971>
- Kılıçaslan, I. ve Özbek, M. (2010). Contributions to the knowledge on the distribution of freshwater Mollusca species of Turkey. *Review of Hydrobiology*, 3(2), 127–144. Erişim Adresi: [https://www.researchgate.net/profile/Murat-Ozbek/publication/257941767\\_Contributions\\_to\\_the\\_knowledge\\_on\\_the\\_distribution\\_of\\_freshwater\\_Mollusca\\_species\\_of\\_Turkey/links/00b7d526669a9e1735000000/Contributions-to-the-knowledge-on-the-distribution-of-freshwater-Mollusca-species-of-Turkey.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Murat-Ozbek/publication/257941767_Contributions_to_the_knowledge_on_the_distribution_of_freshwater_Mollusca_species_of_Turkey/links/00b7d526669a9e1735000000/Contributions-to-the-knowledge-on-the-distribution-of-freshwater-Mollusca-species-of-Turkey.pdf)
- Killeen, I. J., Aldridge, D., Oliver, G. ve Council, F. S. (2004). *Freshwater bivalves of Britain and Ireland*. Field Studies Council. UK.
- Korniushin, A. V. (1996). Bivalve molluscs of the superfamily Pisidioidea in the Palaearctic region: fauna, systematics, phylogeny. National Academy of Science of Ukraine; Schmalhausen Institute of Zoology.
- Koşal-Şahin, S. ve Zeybek, M. (2016). Distribution of Mollusca fauna in the streams of Tunceli Province (East Anatolia, Turkey) and its relationship with some physicochemical parameters. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16: 187–195. [http://doi.org/10.4194/1303-2712-v16\\_1\\_19](http://doi.org/10.4194/1303-2712-v16_1_19)
- Koşal-Şahin, S., Bahadır-Koca, S. ve Yıldırım, M. Z. (2012). New Genera Anatolidamnicola and Sivasi (Gastropoda: Hydrobiidae) from Sivas and Malatya (Turkey). *Acta Zoologica Bulgarica*, 64(4), 341–346. Erişim Adresi: [https://www.researchgate.net/profile/Serap-Kosal-Sahin/publication/289105219\\_New\\_Genera\\_Anatolidamnicola\\_and\\_Sivasi\\_Gastropoda\\_Hydrobiidae\\_from\\_Sivas\\_and\\_Malatya\\_Turkey/links/56ebde6a08aef0fc1c7171b/New-Genera-Anatolidamnicola-and-Sivasi-Gastropoda-Hydrobiidae-from-Sivas-and-Malatya-Turkey.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Serap-Kosal-Sahin/publication/289105219_New_Genera_Anatolidamnicola_and_Sivasi_Gastropoda_Hydrobiidae_from_Sivas_and_Malatya_Turkey/links/56ebde6a08aef0fc1c7171b/New-Genera-Anatolidamnicola-and-Sivasi-Gastropoda-Hydrobiidae-from-Sivas-and-Malatya-Turkey.pdf)
- Kuiper, J. J., Økland, K. A., Knudsen, J., Koli, L., Proschwitz, T. V. ve Valovirta, I. (1989). Geographical distribution of the small mussels (Sphaeriidae) in North Europe (Denmark, Faroes, Finland, Iceland, Norway and Sweden). *Annales Zoologici Fennici*, 73–101. Erişim Adresi: [https://www.jstor.org/stable/23736060?casa\\_token=X5kTCw8Ji8AAAAA%3A7tJtQ\\_pnLR3GZiqvbws7I5SUyOsF1Q7a4nGi9G6i8vB63GKIn\\_jIW94SZrxxRWHned56rrusgKSDP-DhkaA0Of1nJvvggS5YmIJBgkHIcA9pY7FXKJl&seq=1#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/23736060?casa_token=X5kTCw8Ji8AAAAA%3A7tJtQ_pnLR3GZiqvbws7I5SUyOsF1Q7a4nGi9G6i8vB63GKIn_jIW94SZrxxRWHned56rrusgKSDP-DhkaA0Of1nJvvggS5YmIJBgkHIcA9pY7FXKJl&seq=1#metadata_info_tab_contents)
- Lopes-Lima, M., Gürlek, M. E., Kebapçı, Ü., Şereflişan, H., Yanık, T., Mirzajani, A., Neubert, E., Prié, V., Teixeira, A., Gomes-dos-Santos, A., Barros-García, D., Bolotov, I.N., Kondakov, A. V., Vikhrev, I. V., Tomilova, A. A., Özcan, T., Altun, A., Gonçalves, D. V., Bogan, A. E. ve Froufe, E. (2021). Diversity, biogeography, evolutionary relationships, and conservation of Eastern Mediterranean freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 163, 107261. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107261>
- Mandaville, S. M. (2002). *Benthic Macroinvertebrates in Freshwaters Taxa Tolerance Values, Metrics and Protocols*. Nova Scotia: Soil ve Water Conservation Society of Metro Halifax, Canada. Erişim Adresi: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.516.2776&rep=rep1&type=pdf>
- Mason, C. F. (2002). *Biology of Freshwater Pollution*. Newyork: Pretince-Hall (Pearson Education). ISBN: 0130906395, 9780130906397
- Miller, R. G., Kopfler, F. C., Kelty, K. C., Stober, J. A. ve Ulmer, N. S. (1984). The occurrence of aluminum in drinking water. *Journal-American Water Works Association*, 76(1), 84–91. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1984.tb05267.x>
- Odabaşı, D. A., Kebapçı, Ü. ve Akbulut, M. (2013). Description of a new *Pseudobithynia* n. sp.(Gastropoda: Bithyniidae) from Northwest Turkey. *Journal of Conchology*, 41(4), 527–532. [https://www.researchgate.net/profile/Deniz-Odabasi/publication/259578973\\_Description\\_of\\_a\\_new\\_pseudobithynia\\_n\\_sr\\_Gastropoda\\_Bithyniidae\\_from\\_Northwest\\_Turkey/links/0c96052cbb4c55cfd6000000/Description-of-a-new-pseudobithynia-n-sr-Gastropoda-Bithyniidae-from-Northwest-Turkey.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Deniz-Odabasi/publication/259578973_Description_of_a_new_pseudobithynia_n_sr_Gastropoda_Bithyniidae_from_Northwest_Turkey/links/0c96052cbb4c55cfd6000000/Description-of-a-new-pseudobithynia-n-sr-Gastropoda-Bithyniidae-from-Northwest-Turkey.pdf)
- Odabaşı, D. A. ve Georgiev, D. (2014). *Bythinella kazdagensis* sp. n.(Gastropoda: Rissooidea) from the Mount Ida (Kaz Dağı)-Northwestern Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, 66(1), 21–24. Erişim adresi: [https://www.researchgate.net/profile/Dilian-Georgiev/publication/261251591\\_Bythinella\\_kazdagensis\\_sp\\_n\\_Gastropoda\\_Rissooidea\\_from\\_the](https://www.researchgate.net/profile/Dilian-Georgiev/publication/261251591_Bythinella_kazdagensis_sp_n_Gastropoda_Rissooidea_from_the)

[Mount Ida Kaz Dagi Northwestern Turkey/links/00463533b2fab81b1b000000/Bythinella-kazdagensis-sp-n-Gastropoda-Rissooidea-from-the-Mount-Ida-Kaz-Dagi-Northwestern-Turkey.pdf](https://doi.org/10.1080/09397140.2020.1739370)

- Odabaşı, D. A., Akay, E., ve Koyuncuoğlu, S. (2020). *Pseudamnicola thalesi* sp. n.(Gastropoda: Truncatelloidea: Hydrobiidae), a new freshwater gastropod species from Western Turkey. *Zoology in the Middle East*, 66(2), 140–144. <https://doi.org/10.1080/09397140.2020.1739370>
- Odabaşı, S. ve Büyükkateş, Y. (2009). Klorofil-a, çevresel parametreler ve besin elementlerinin günlük değişimleri: Sarıçay akarsuyu örneği (Çanakkale, Türkiye). *Ekoloji*, 19(73), 76–85. <https://doi.org/10.5053/ekoloji.2009.7310>
- Odabaşı, S., Arslan, N., Özdilek, Ş. Y. ve Odabaşı, D. A. (2019). An Invasion Report of The New Zealand Mud Snail, *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) in Turkish Freshwaters: Delice River and Kocabaş Stream. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 5(3) 213–219. <https://www.doi.org/10.17216/Limnofish.486626>
- Öktener, A. (2004). Sinop ve Bafra'da Bazı Tatlısulardaki Mollusca Türleri Üzerine Ön Araştırma. *Gazi Üniversitesi Journal of Science*, 17(2), 21–30.
- Öztürk, B., Önen, M. ve Doğan, A. (2008). *Türkiye Denizel Mollusca Türleri Tayin Atlası*. Ankara, The Scientific and Technical Research Council of Turkey (TÜBİTAK) 103T154, 468.
- Rosenberg, D. M. (1998). A national aquatic ecosystem health program for Canada: We should go against the flow. *Bulletin of Entomological Society Canada*, 30(4), 144–152.
- Rosenberg, D. M. ve Resh, V. H. (1993). *Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*, New York Chapman and Hall. <https://doi.org/10.2307/2404174>
- Roth, J. R. (1839). Molluscorum species, quas in itinere per Orientem facto comites Schuberti M. Erdl et JR Roth collegerunt. Diss. inaug. Wolf.
- Salanki, J., Salanki A. F. Kamardina T. ve Rozsa K. S. (2003). Molluscs in biological monitoring of water quality, *Toxicology Letters* 140-141, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00036-5)
- Salanki, J. (1989). New avenues in the biological indication of environmental pollution. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 40, 295–328. Erişim adresi: <https://europemc.org/article/med/2486724>
- Sands, A. F., Glöer, P., Gürlek, M. E., Albrecht, C. ve Neubauer, T. A. (2020) A revision of the extant species of *Theodoxus* (Gastropoda, Neritidae) in Asia, with the description of three new species. *Zoosystematics and Evolution*, 96 (1), 25–66. <https://doi.org/10.3897/zse.96.48312>
- Sarı, H. M., Balık, S., Ustaoglu, M. R. ve İlhan, A. (2006). Distribution and ecology of freshwater ichthyofauna of the Biga Peninsula, North-western Anatolia, Turkey. *Turkish Journal Zoology* 30, 35–45. Erişim adresi: <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/issues/zoo-06-30-1/zoo-30-1-5-0411-4.pdf>
- Schütt, H. (1965). Zur Systematik und ökologie Türkischer Süßwasserprosobranchier. *Zoologische mededelingen*, 41(3) 43–73. Erişim adresi: <https://repository.naturalis.nl/pub/318817>
- Schütt, H. ve Bilgin, F. H. (1970). *Pseudamnicola geldiyana* n. sp., a spring-inhabiting snail of the Anatolian Plateau. *Archiv für Molluskenkunde*, 100, 151–158.
- Schütt, H. (1964). Die Molluskenfauna eines reliktiiren Quellsees der südlichen Türkei, *Archive für Molluskenkunde*, 93:173–180.
- Schütt, H. ve Şeşen. R. (1993). *Pseudamnicola* species and other Freshwater Gastropods (Mollusca-Gastropoda) from East Anatolia (Turkey), the Ukraine and Lebanon, *Basteria*, 57:161–171. Erişim adresi: <https://natuurtijdschriften.nl/pub/597025>
- Seddon, M. B., Kebapçı, Ü. ve Van Damme, D. (2014). *Valvata piscinalis*. The IUCN Red List of Threatened Species. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T156186A42435636.en>.
- Semenchenko, V., Laenko, T. ve Razlutski, V. (2008). A New Record of the North American gastropod *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) from the Neman Stream Basin, Belarus. *Aquatic Invasions*, 3(3), 359–360. <https://doi.org/10.3391/ai.2008.3.3.14>
- Stanczykowska, A., Lewandowski, K. ve Ejsmont-Karabin J. (1983). Biotic structure and processes in the lake system of R. Jorka watershed (Masurian Lakeland, Poland). IX. Occurrence and distribution of molluscs with special consideration to *Dreissena polymorpha* (Pall.). *Ekologia Polska*, 31(3) 761–780. Erişim adresi: <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=9571500>
- Sturany, R. (1894). Zur Molluskenfauna der europaischen Türkei, Ann. des K. K. Naturhist. Hofmuseums, *Separatabdruck aus Band* 9(3–4): 369–394. Erişim adresi: <https://www.jstor.org/stable/41767771>
- Tomilova, A. A., Lyubas, A. A., Kondakov, A. V., Konopleva, E. S., Vikhrev, I. V., Gofarov, M. Y., ... ve Bolotov, I. N. (2020). An endemic freshwater mussel species from the Orontes River basin in Turkey and Syria represents duck mussel's intraspecific lineage: Implications for conservation. *Limnologia*,



- 84, 125811. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2020.125811>
- Ustaoglu, M. R., Balık, S. ve Özbek, M. (2001). Işıklı Gölü (Çivril-Denizli)'nün Mollusca faunası. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1-2), 135-139. Erişim adresi: <http://www.egejfas.org/en/download/article-file/58099>
- Ustaoglu, M. R., Balık, S. ve Özbek, M. (2003). Yuvarlakçay'ın (Köyceğiz-Muğla) Mollusca Faunası. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 20(3): 433-438. Erişim adresi: <http://www.egejfas.org/en/download/article-file/57992>
- Yıldırım M.Z. (1999). Türkiye Prosobranchia (Gastropoda: Mollusca) türleri ve zoocoğrafik yayılışları 1. Tatlı ve Acı Sular. *Turkish Journal of Zoology*, 23(3), 877-900. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/135345>
- Yıldırım, M. Z., Kebapçı, Ü., Koca, S. B. ve Yüce, A. (2015). New *Bythinella* (Gastropoda, Bythinellidae) species from western Turkey. *ZooKeys*, 481, 1-13. <https://doi.org/10.3897/zookeys.481.8225>
- Yıldırım, M. Z., Gümüş, B. A., Kebapçı, Ü. ve Koca, S. B. (2006). The basommatophoran pulmonate species (Mollusca: Gastropoda) of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 30(4), 445-458. Erişim adresi: <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/issues/zoo-06-30-4/zoo-30-4-14-0512-8.pdf>





## Gelibolu Yarımadası Savaş Arkeojeofiziği Çalışmaları: Şahindere Şehitliği ve Lone Pine Anıtı Örnek Bölgeleri

Cahit Çağlar Yalçiner<sup>1\*</sup>, Yunus Can Kurban<sup>2</sup>, Erdem Gündoğdu<sup>1</sup>, Mehmet Ali Yücel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Madencilik ve Maden Çıkarma Bölümü, Çan Meslek Yüksekokulu, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup> Jeoloji Mühendisliği Bölümü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

<sup>3</sup> Harita Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

### Makale Tarihiçesi

Gönderim: 05.04.2021  
Kabul: 21.06.2021  
Yayın: 20.09.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** – Çanakkale Savaşı (Çanakkale Muharebeleri), I. Dünya Savaşı sırasında 1915–1916 yılları arasında Gelibolu Yarımadası'nda Osmanlı İmparatorluğu ile İtilaf Devletleri arasında yapılan deniz ve kara muharebeleridir. Dünyanın en kanlı ve yoğun çarpışmalarının yaşandığı cephelerde, özellikle İtilaf Devletlerinin kayıpları ile beraber geri çekilme süreçlerinde mühimmat ve teçhizatlarını yanlarına almadan gerek gömerek gerekse tahrip ederek arkalarında bırakmışlardır. Gelişen teknolojik yenilikler sayesinde yeraltında gömülü durumda bulunan obje ya da kalıntılar, planlanan bölgelerde yapılan jeofizik, jeodezik ve uzaktan algılama çalışmaları ile belirlenmiştir. Çalışma kapsamında ilk olarak; tüm alanlarda İHA görüntüleri yardımıyla sayısal yükseklik modeli oluşturulmuş ve ortofotolar üzerinden yer belirleme çalışmaları yapılmıştır. Yerden, gözle belirlenemeyen siper ve çukur gibi birçok unsur bu model sayesinde belirlenmiştir. Ayrıca İHA görüntüleri, yüksek hassasiyetli GPS ile uygulanan yeraltı radarı (GPR) ölçümlerinde de altlık olarak kullanılmıştır. Çalışma kapsamında araştırma bölgeleri Şahindere Şehitliği ve Lone Pine Anıtı çevresi olarak seçilerek jeofizik, jeodezik ve uzaktan algılama-insansız hava aracı (İHA) uygulamaları yapılmıştır. Şahindere Şehitliğindeki ölçümler ile şehitlik alanın bilinen halinden çok daha geniş olduğu belirlenmiştir. Lone Pine bölgesinde yapılan ölçümler ile siper hatlarını birbirine bağlayan tünel yerleri tam olarak haritalanmıştır. Bu kapsamda yapılan ilk ayrıntılı çalışma olan bu uygulama; hem bilinen verilere büyük katkı sağlamış, hem ileride yapılacak çalışmalara yön verecek bulgular sağlamıştır.

**Anahtar Kelimeler** – Arkeojeofizik, Gelibolu yarımadası, savaş kalıntıları, şehitlik alanları, yeraltı radarı (GPR)

## Gallipoli Peninsula War Archeogeophysics Studies: Şahindere Martyrdom and Lone Pine Monument Sample Study Sites

<sup>1</sup> Department of Mining and Mineral Extraction, Çan Vocational School, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup> Department of Geology Engineering, Eskişehir Osmangazi University, Eskişehir, Turkey

<sup>3</sup> Department of Geomatics Engineering, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

### Article History

Received: 05.04.2021  
Accepted: 21.06.2021  
Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** – The Dardanelles Battle were sea and land battles between the Ottoman Empire and the Entente States during the WW1 between 1915-1916 on the Gallipoli Peninsula. On the fronts where the world's most bloody and intense battles were experienced, especially in the withdrawal processes of the Entente States, they left behind both burying and destroying the ammunition and equipment without taking them with them. Due to the technological innovations, the determination of the objects or remains buried underground was determined by geophysical, geodetic and remote sensing studies in the determined regions. Within the scope of the study first, a digital elevation model of study areas was created with the help of UAV images and location studies were carried out on orthophotos. Many elements such as trenches and pits that cannot be detected from the ground have been determined by this model. In addition, UAV images were also used as a base for Ground Penetrating Radar (GPR) measurements applied with high-sensitivity GPS. In this study, the research areas were selected as, Şahindere Martyrdom and Lone Pine Monument area, and geophysical, geodetic, remote sensing-UAV applications were completed. With the measurements in the Şahindere Martyrdom, it was determined that the martyr area was much wider than the current state. The measurements made at the Lone Pine site and the tunnel locations connecting the trench lines were clearly mapped. This is the first detailed study in this context, which has contributed greatly to the current data and provided findings that will guide future studies.

**Keywords** – Archaeogeophysics, Gallipoli peninsula, war remnants, martyrdom, ground penetrating radar (GPR)

<sup>1</sup> yalciner@comu.edu.tr\*

<sup>2</sup> ykurban@gmail.com

<sup>3</sup> erdem@comu.edu.tr

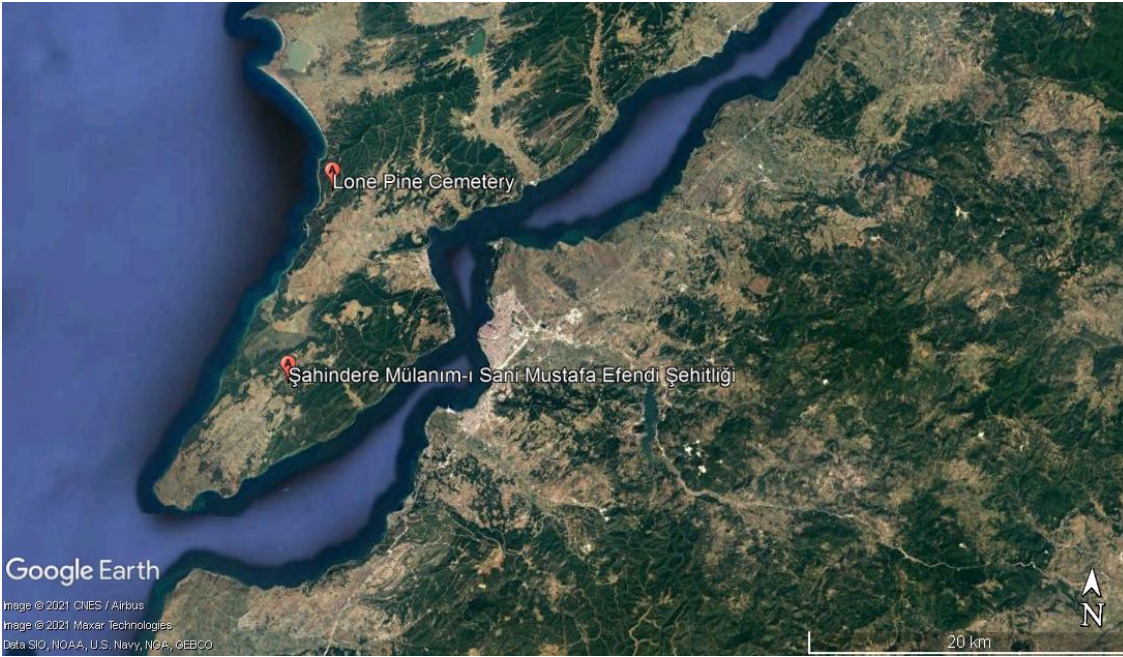
<sup>4</sup> aliyucel@comu.edu.tr

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Çanakkale savaşlarında gerek alanın genişliği gerekse savaşın şiddetine bir de süre bakımından oldukça kısa zamanda gerçekleşmesi eklendiğinde hem şehitlik alanların yerlerinin hem de savaş kalıntılarının yerlerinin tam bilinmemesi normaldir. Bu doğrultuda önceki çalışmalar sığ jeofizik yöntemlerdeki gelişmelerin yeraltında gömülü durumda bulunan yapısal unsurların (mezar, top, mühimmat gibi) ortaya çıkarılmasında ve İHA çalışmalarının ise siperlerin belirlenmesini kolaylaştırdığı görülmektedir ([Büyüksaraç, Bektaş, Tulunay, ve Ateş, A., 2013](#); [Büyüksaraç vd. 2014](#); [Yalçiner, 2012](#); [Yücel, Yücel, Yalçiner, ve Yılmaz, 2018](#)).

Çanakkale savaşlarında kaybettiğimiz şehitlerimizin naaşlarının yerlerinin belirlenmesi ve aradan geçen 103 yıl sonra bile gereken saygıya kavuşmaları için gereken çalışmaları yapmak bu çalışmadaki en önemli amaç olmuştur. Çalışma alanının tüm cephelere yönelik olmasının gerek zaman gerekse sonuçların yorumlanması açısından etkin olmayacağı açıktır. Bu doğrultuda çalışmaların ilk aşaması olarak saha belirleme ve gözlemlerin yapılarak doğru noktaların belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Özellikle İtilaf devletlerinin kara harekâtına yönelik çıkartma yaptığı sahil kesimleri öncelikli olmuştur ([Şekil 1](#)). Bununla beraber yerleri kesin olarak belli olmayan şehitlik alanları da hem jeofizik yöntemler ile araştırılacak hem de yüzeydeki durumları insansız hava aracı (İHA) yardımı ile haritalanmıştır.



Şekil 1. Google Earth görüntüsü üzerinde çalışma alanlarının gösterimi

## 2. Materyal ve Yöntem

Çalışmanın başlangıcında literatür ve ofis çalışmaları ışığında belirlenen bölgeler üzerinde jeolojik ve jeomorfolojik gözlemler yapılmıştır. Hava ve uydu fotoğraflarının, topografik haritalar ile karşılaştırılması ile arazinin ayrıntılı topoğrafyası sayısal olarak oluşturulmuştur. Buna destek olarak İHA ile uygulanan fotogrametrik çalışmalar ile ölçüm sahalarının yüksek çözünürlüklü sayısal yükseklik modeli ve ortofotosu oluşturulmuştur. Bu sayede uygulanacak olan jeofizik ölçümlerin yerleri tam olarak sayısal ortamda da işlenmiştir.

Yeraltı radarı yönteminde (GPR); yatay doğrultuda yere uygulanan birçok jeofizik yöntem, son yıllarda yapılarda da etkili şekilde uygulanmaktadır. Özellikle hasar vermeden inceleme gerektiren tarihi binalarda oldukça önemli bir üstünlük sağlanmaktadır. Farklı jeofizik yöntemlerin birçok tarihi bina inceleme projesinde başarıyla uygulanmasına karşın, en etkili yöntemin yeraltı radarı yöntemi (GPR) olduğu çoğu uygulayıcı

tarafından kabul görmektedir. Yeraltı radarı, arkeolojik alanlarda ve kültürel miras araştırmalarında oldukça etkili ve yaygın şekilde kullanılan bir jeofizik yöntemdir ([Martínez-Garrido, Fort, Gómez-Heras, Valles-Iriso, ve Varas-Muriel, 2018](#); [Johnston, Ruffell, McKinley, ve Warke, 2018](#); [Yalçiner, Kurban, ve Altinel, 2017](#); [Yalçiner, Büyüksaraç, ve Kurban, 2019](#)). Yeraltı radarı yöntemi (GPR), elektromanyetik sinyallerin iletimi ve daha sonra bilinen süreksizliklerin ürettiği yansımaların alınması yoluyla duvarlar ve zeminler altındaki yüzeyden görülemeyen yapıyı ortaya çıkarabilmektedir ([Ming-Chih, Yu-Ming, Kun-Fa, ve Hui-Chi, 2009](#); [Persico, Ciminale, and Matera, 2014](#)). Yüksek frekanslı yeraltı radarı yöntemi (GPR) ölçüm düzeneği gereği var olan antenler, 1-60 ns aralığında, çok yüksek ve aşırı çok yüksek (30-3000 MHz) bandında kısa elektromanyetik sinyal gönderir. Yeraltı radarı yöntemi (GPR), tahribatsız kolay uygulanabilirliği ve yüksek hassasiyetteki yüksek çözünürlükte verdiği sonuçlar sayesinde, mühendislik jeolojisinden, çevre araştırmalarına, arkeolojik çalışmalardan, yapısal mühendislik çalışmalarına kadar birçok alanda kullanılmaktadır ([Daniels, 2004](#)). Son olarak, yine İstanbul'da Kariye Müzesi restorasyonu öncesi yaptıkları çalışmada [Yalçiner vd. \(2019\)](#), yeraltı radarı yöntemi (GPR) ve Ultrasonik Darbe Hızı (UPV) Testini kapsayan tahribatsız test tekniklerini kullanarak yapısal elemanların taş kalitesi, yapı içi geometrisi ve fiziksel özelliklerini yorumlamışlardır. Benzer şekilde çok sayıda çalışmada bu yöntem ile tarihi yapıların hasarsız incelemeleri yapılmıştır ([Leucci, Masini, Persico, ve Soldovieri, 2011](#); [Leucci, Masini, ve Persico, 2012](#); [Moropoulou, Labropoulos, Delegou, Karoglou, ve Bakolas, 2013](#); [Kanlı vd., 2015](#); [Gil, Mas, Lerma, Torner, ve Vercher, 2019](#)). Teknolojik gelişmeler sayesinde yüksek frekanslı antenlerin (450 MHz - 2.3 GHz) kullanılması ile tarihi önem taşıyan binaların ve yapıların restorasyon çalışmalarında da vazgeçilmez bir tahribatsız araştırma yöntemi (NDT) olarak kendine yer bulmuştur ([Yalçiner vd., 2019](#)). Bu çalışmada da yeraltı radarı yöntemi tahribatsız olarak çalışma sahalarında ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 6 m nüfuz derinliğine kadar yüksek çözünürlüklü görüntüler elde etmek için Mala marka 450 MHz HDR PRO cihazı ile hem yatay hem dikey doğrultuda uygulanan ölçümler ile taramalar gerçekleştirilmiştir ([Şekil 2](#)). Ölçümlerde kullanılan parametreler [Tablo 1'de](#) verilmiştir.



Şekil 2. Çalışmada kullanılan 450 MHz HDR anten ile yeraltı radarı (GPR) uygulaması



Tablo 1

Yeraltı radarı yöntemi (GPR) ile yapılan ölçümlerde kullanılan parametreler

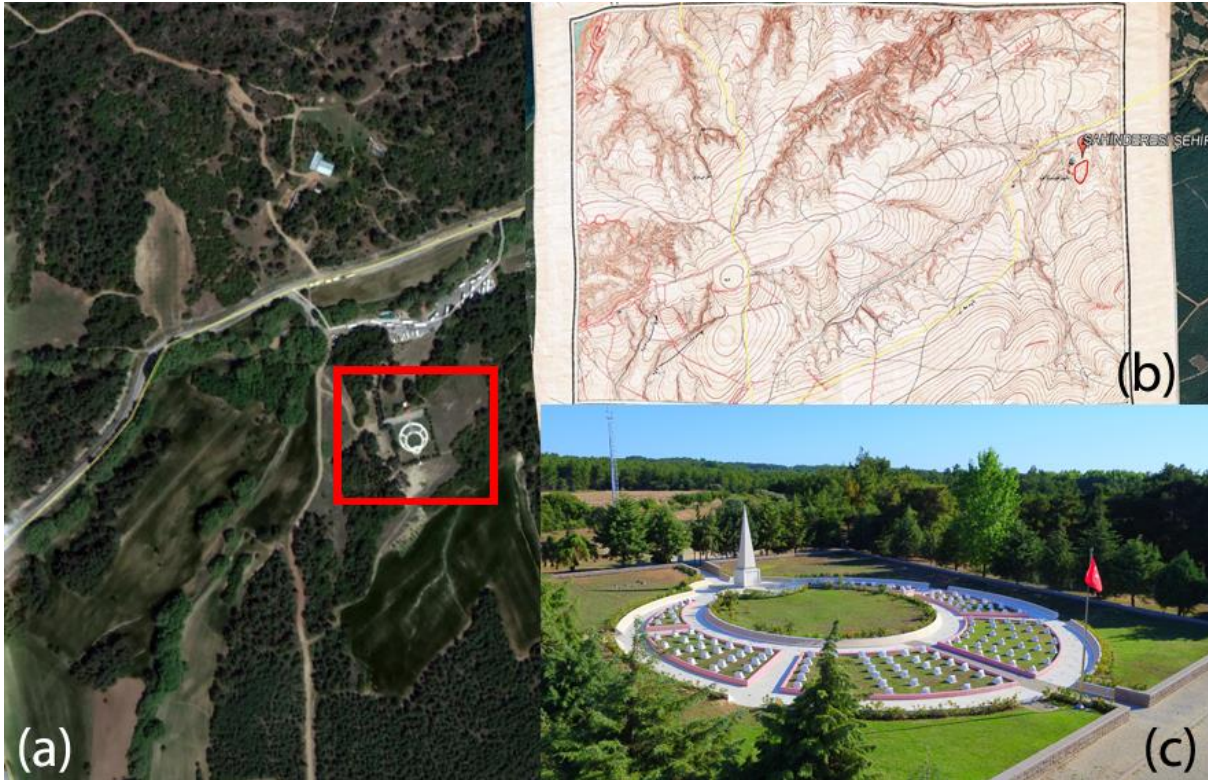
Anten Frekansı	450 MHz (HDR)
İz Aralığı	0.035 m
Örnek Sayısı	512
Örnekleme Frekansı	5120 MHz
Zaman Penceresi	114.45 ns
Profil Aralığı	0.5 m

Yeraltı radarı profillerinin sayısal olarak yorumlanması, aslında jeoradar sinyali tarafından üretilen parabollerin incelenmesi ve tekdüze olmayan daha yüksek yoğunluklara sahip alanların aranması işlemidir. Bu işlem tarihsel binalar altındaki yapıların yerini ve boyutlarını doğrulamak için tahribatsız araştırma yöntemi (NDT) yaklaşımı olarak ele alınmaktadır. Yapılan veri işlem sürecinde her profil için sinyal genlikleri gruplanır ve aralarında bir karşılaştırma yapılır. Daha sonra sinyalin genliğinde ilk önemli değişikliğin olduğu derinlik aranır. Yeraltı Radarı sinyalinin zayıflamasına neden olan gerekçe tanımlanır. Son olarak, sinyalin yayılım koşullarındaki değişiklikleri ölçmek için yazılım filtreleri kullanılır.

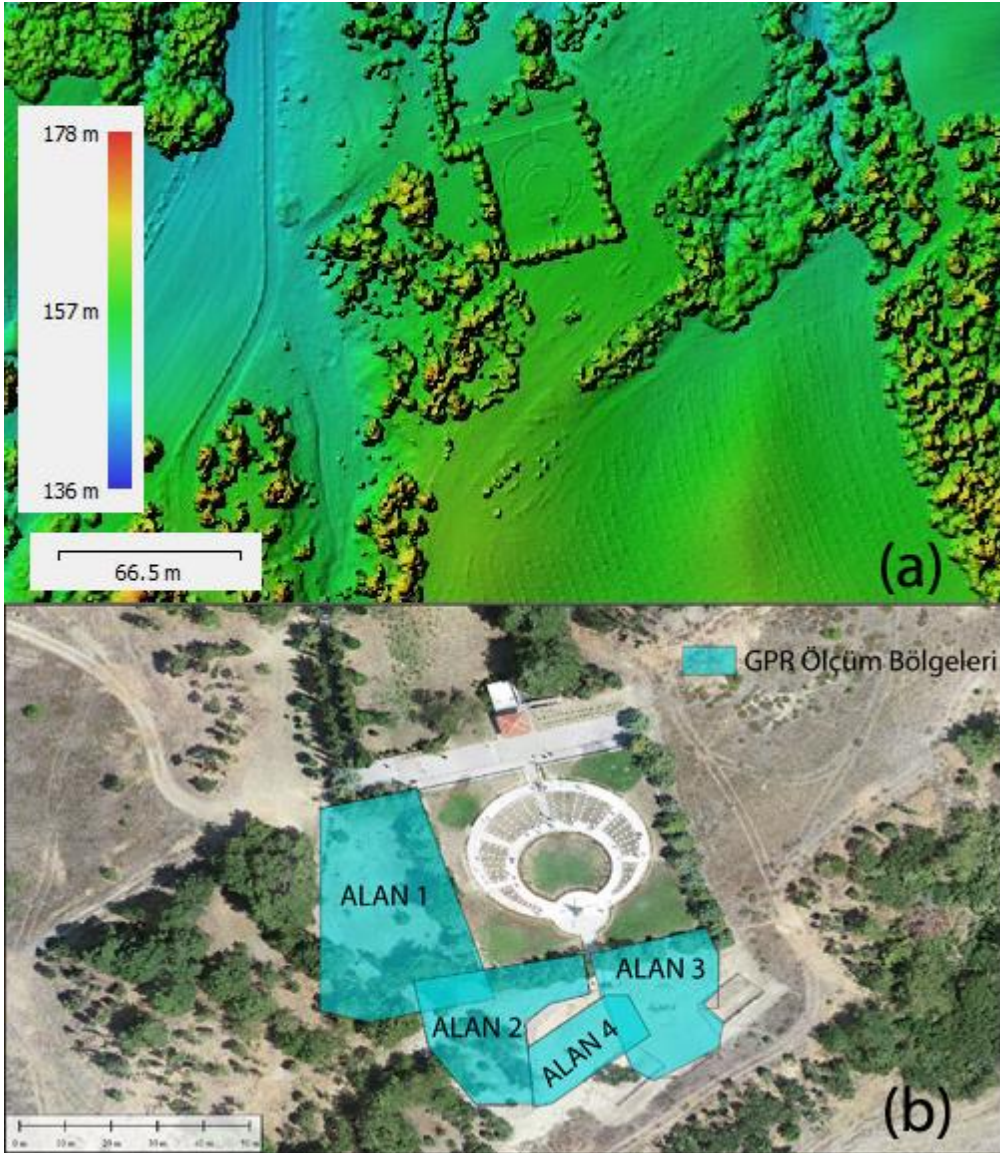
### 3. Saha Çalışmaları

#### 3.1. Şahindere Şehitliği

Şahindere Şehitliği Şevki Paşa haritalarında da tam olarak belirtilmiş ve günümüzde Şehitlik olarak düzenlenmiştir (Şekil 3). Çalışmalarda ilk olarak İHA görüntülerinden üretilen sahanın koordinatlı 3 boyutlu sayısal yükseklik modeli oluşturulmuştur (Şekil 4a). Daha sonra ise belirlenen 4 farklı alanda yeraltı radarı yöntemi (GPR) ile ölçümler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4b).



Şekil 3. Şahindere Şehitliği gösterimi.(a) Googleearth üzerinde yeri (kırmızı kutu). (b) Şevki Paşa haritasında yeri. (c) Günümüzdeki Şehitlik gösterimi.

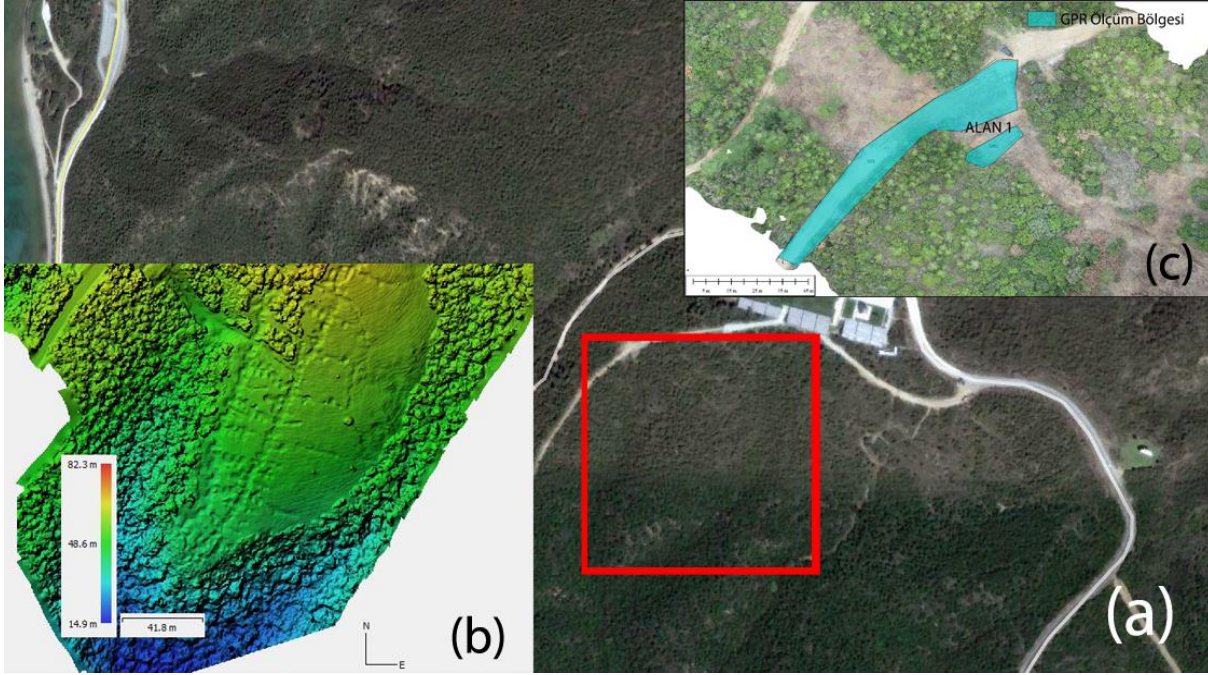


Şekil 4. UAV ile elde edilen yükseklik modeli ve yüksek çözünürlüklü ortofoto. (a) Şahindere Şehitliği çalışma alanının İHA görüntülerinden üretilen sayısal yükseklik modeli. (b) Şahindere Şehitliğinde, yeraltı radarı yönteminin (GPR) uygulandığı alanlar.

### 3.2. Lone Pine

Lone Pine, yani Yalnız Çam, ismini Avustralyalı askerlerin 25 Nisan 1915'te çıkartmadan buraya geldiklerinde büyüdüğünü gördükleri tek çam ağacından alıyor. Çanakkale'nin Eceabat ilçesine bağlı Kocadere Köyü sınırları içerisinde yer alan mezarlığın doğu ucunda da aynı isimle anılan bir anıt var. 25 Nisan 1915 tarihinden ağustos ayına kadar Lone Pine'de çok ağır çarpışmalar meydana gelmiş. Çalışmalarda ilk olarak İHA görüntülerinden üretilen sahanın koordinatlı 3 boyutlu sayısal yükseklik modeli oluşturulmuştur (Şekil 5). Daha sonra ise belirlenen uygun alanda, yeraltı radarı yöntemi (GPR) ile ölçümler gerçekleştirilmiştir (Şekil 5c).

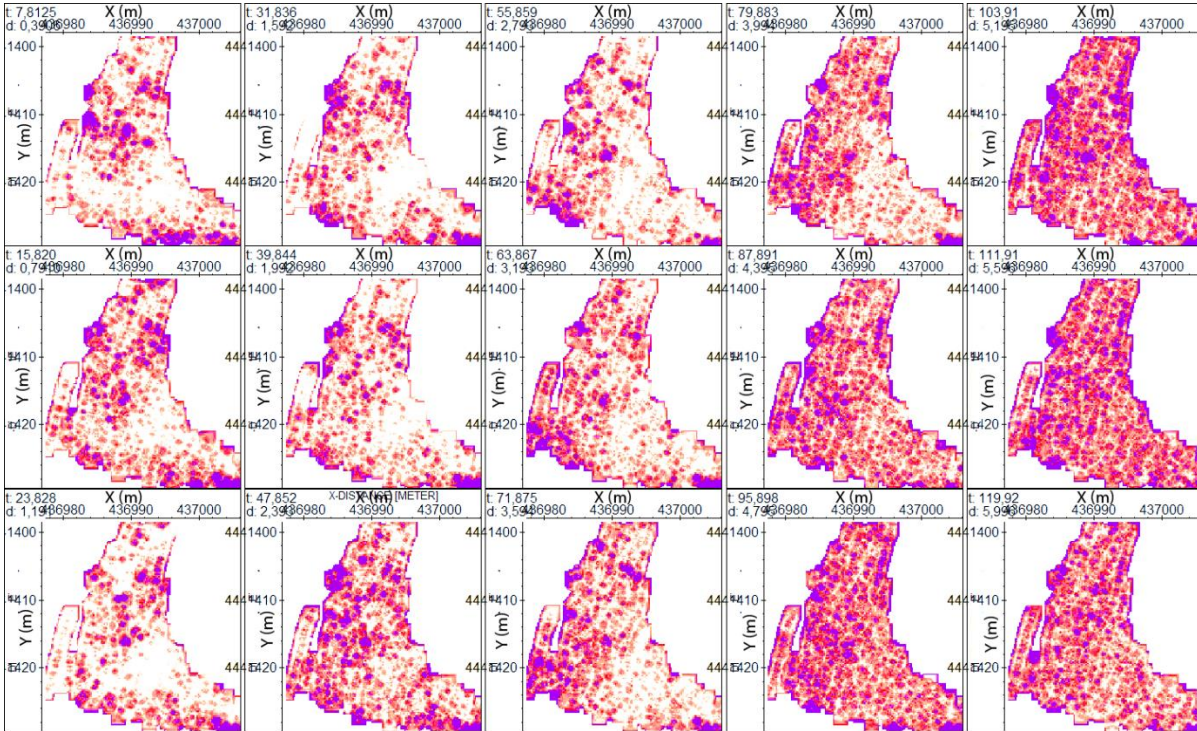




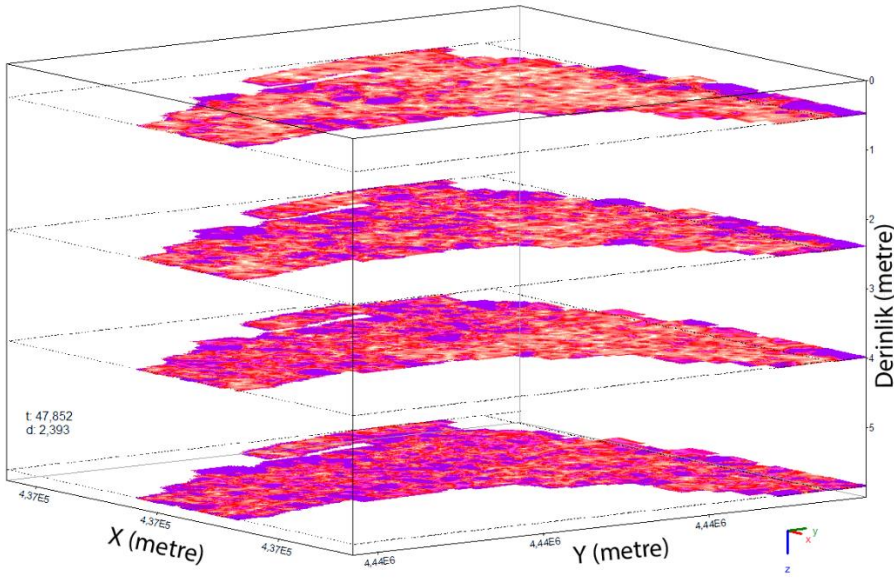
Şekil 5. Lone Pine çalışma alanının (a) GoogleEarth fotoğrafında gösterimi (kırmızı kutu). (b) İHA görüntülerinden üretilen sayısal yükseklik modeli. (c) Yeraltı radarı yönetimin (GPR) uygulandığı alanlar.

#### 4. Bulgular

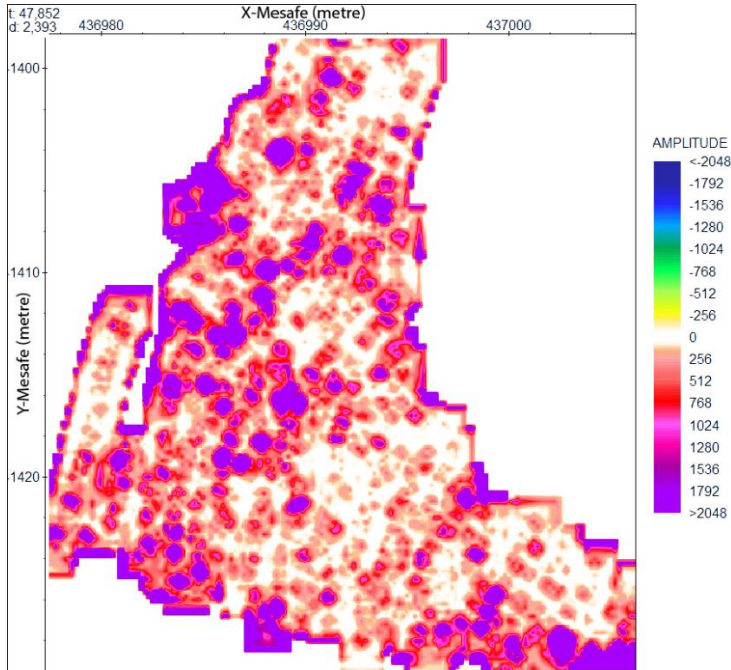
Çalışma yapılan bölgelerde toplanan veriler işlenerek 3 boyutlu hacimsel veri haline dönüştürülmüştür (Şekil 6). Bu verilerin 3 boyutlu hale getirilmesi sayesinde ayrıntılı derinlik gösterimleri kat haritası olarak da hazırlanmış (Şekil 7) ve en iyi temsil eden derinlikler belirlenerek yorumlamada kullanılmıştır (Şekil 8).



Şekil 6. Şahindere Şehitliği çalışma bölgesi Alan 2'de elde edilen yeraltı radarı (GPR) verilerinin tüm derinliklerde gösterimi (koyu renkli alanlar belirtilere karşılık gelmektedir).



Şekil 7. Şahindere Şehitliği çalışma bölgesi Alan 2’de elde edilen yeraltı radarı (GPR) verilerinin derinlik kesitlerinin gösterimi (koyu renkli alanlar belirtilere karşılık gelmektedir).

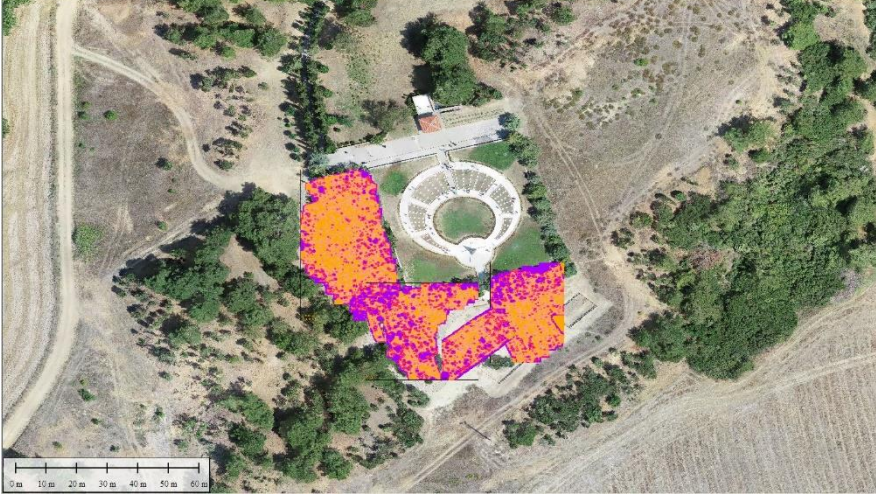


Şekil 8. Şahindere Şehitliği çalışma bölgesi Alan 2’de elde edilen yeraltı radarı (GPR) verilerinin en iyi derinlik olan 240 cm derinlik gösterimi (koyu renkli alanlar belirtilere karşılık gelmektedir).



#### 4.1. Şahindere Şehitliği

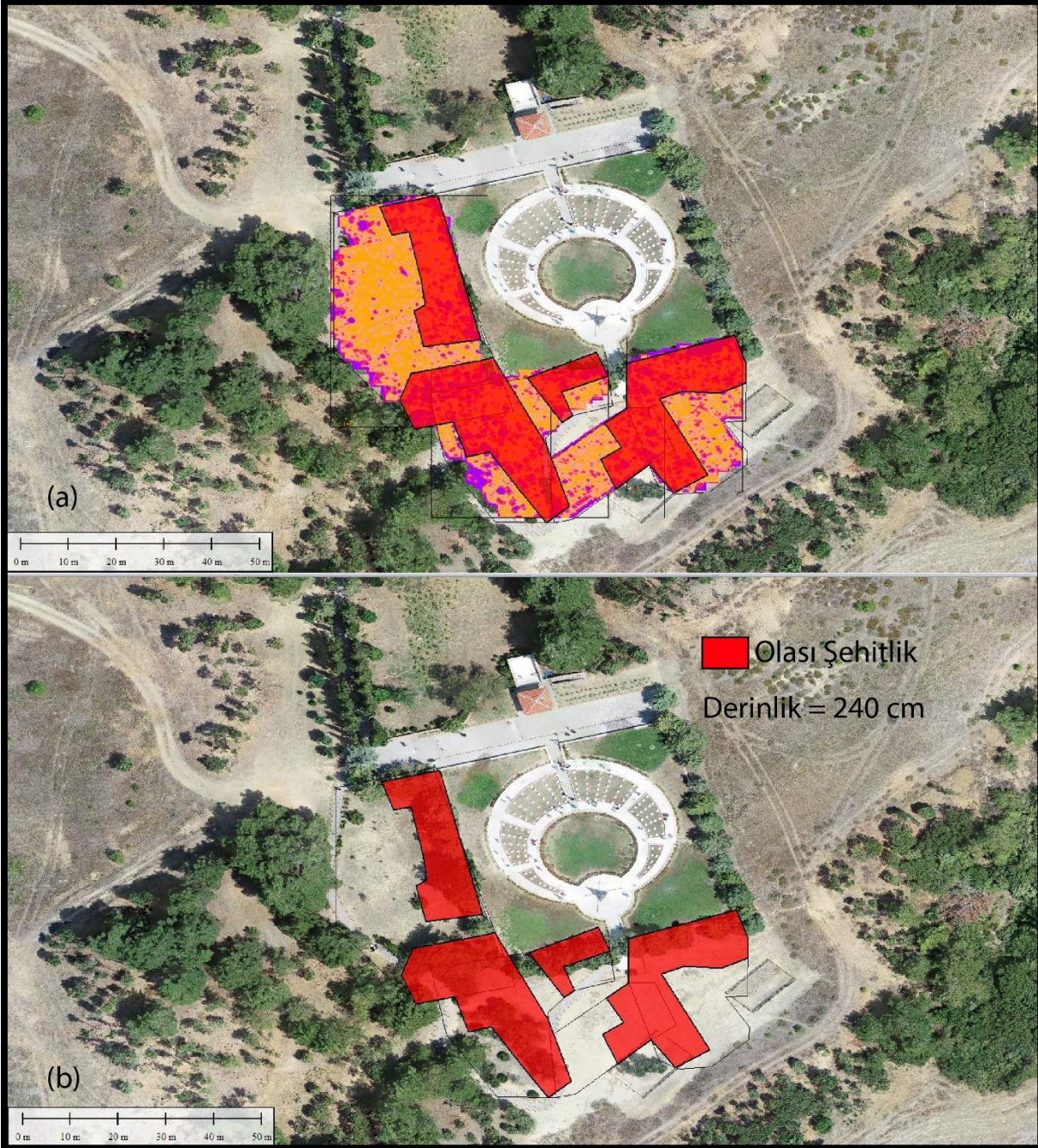
Şahindere Şehitliği çalışmaları 4 bölgede uygun yerler seçilerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 4). Alanlar İHA görüntülerinden hazırlanan ayrıntılı ortofoto üzerine incelenen 4 ayrı bölgenin genel olarak en iyi belirtiyi temsil eden derinlik seçilerek yerleştirilmiş ve yoruma hazırlanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Şahindere Şehitliği çalışma alanında uygulanan yeraltı radarına (GPR) ait sonuçlar (koyu renkli alanlar belirtilere karşılık gelmektedir).

Şahindere Şehitliği çevresinde yapılan çalışmalar tüm alanlarda olduğu gibi İHA uçuşları ile başlamış ve günümüzdeki şehitlik içerisini kapsamayacak şekilde en uygun olan 4 ayrı alanda gerçekleştirilmiştir (Şekil 4b). Ölçüm yapılan her alanda “Olası Şehitlik” diye tanımlanabilecek belirtiler yaklaşık 240 cm derinlikte karşımıza çıkmıştır (Şekil 10). Normalde mezar için fazla olan bu derinliğin çevre düzenlemesi yapılmış alanda olası bir değer olduğu anlaşılmıştır. Bölgede yapılan ölçümler sonucu belirlenen olası Şehitlik alanları belirti olarak birbirlerine çok yakın olduğu için sayı vermekten kaçınılmıştır. Alan olarak yaklaşık 1130 m<sup>2</sup> hesaplanmış bu da toplam ölçüm alanın yaklaşık 2300 m<sup>2</sup> olduğu için %50’sine karşılık gelmektedir. Kaba bir hesap ile mezarların 2 m<sup>2</sup> civarında bir alan kapladığı düşünüldüğünde ise yaklaşık 500 – 550 olası Şehit Mezarı olma ihtimali bulunmaktadır.



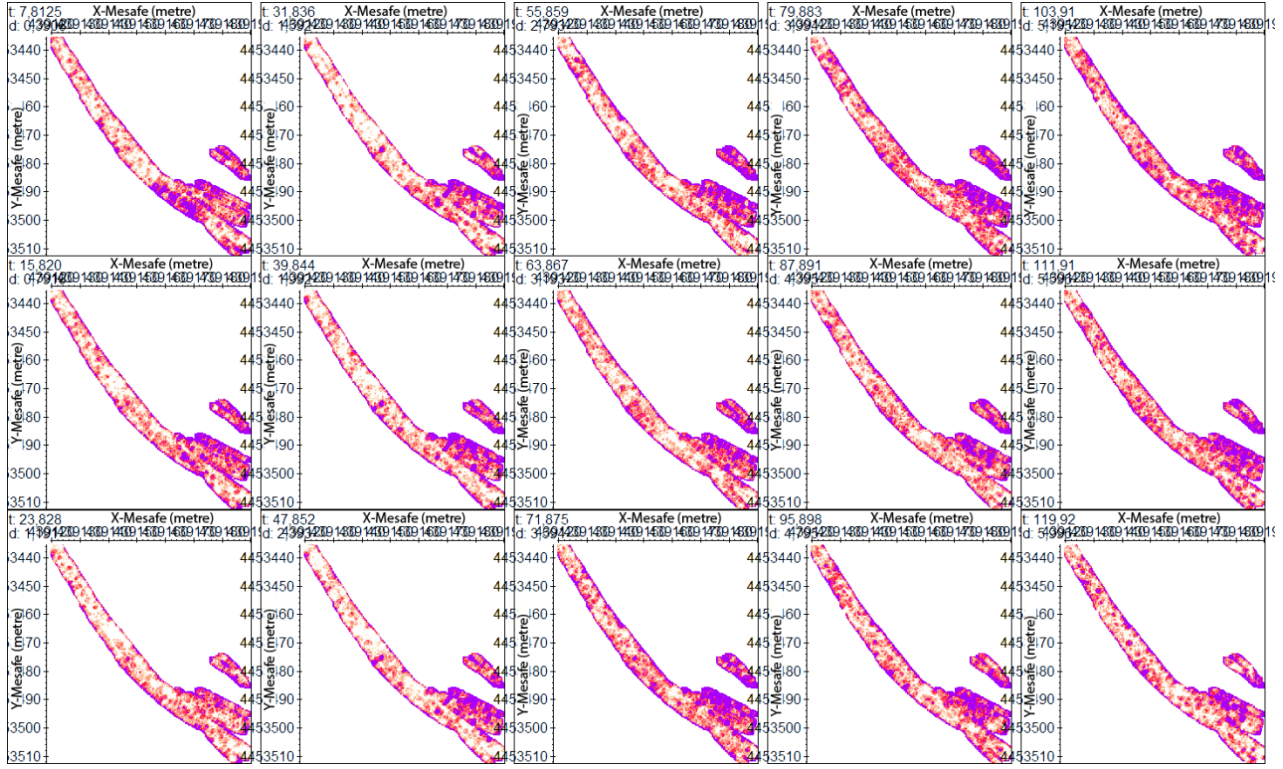


Şekil 10. Şahindere Şehitliği ölçüm bölgesinde elde edilen sonuçların gösterimi. (a) Yeraltı radarı (GPR) ile elde edilen verilerin üzerine belirtilerin yerleştirilmiş görüntüsü. (b) Belirlenen bulguların ortofoto üzerinde gösterimi.

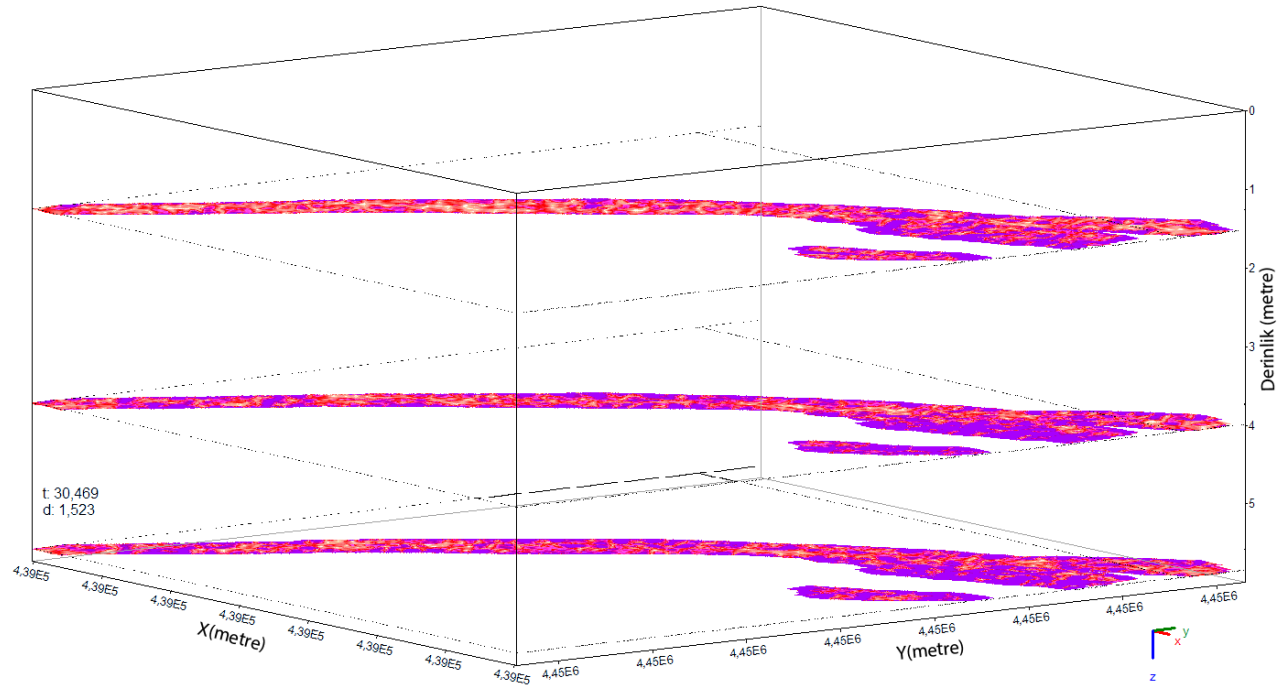
#### 4.2. Lone Pine

Lone Pine çalışma alanında İHA ölçümleri sonrasında yaklaşık 1100 m<sup>2</sup>'lik bir alanda yeraltı radarı (GPR) ölçümleri devam etmiştir ([Şekil 5c](#)). Yapılan ölçümlerin gösterimi için derinlik haritası oluşturulmuştur ([Şekil 11](#)). Bu derinliklerin daha iyi tanımlanabilmesi için derinlik kesiti haritası oluşturulmuştur ([Şekil 12](#)). Elde edilen derinlik haritasında asıl yapısal unsurların 150 cm derinde olduğu görülmüştür ([Şekil 13](#)). En iyi temsil ettiği düşünülen 150 cm derinlikteki yapısal unsur İHA görüntülerinden oluşturulmuş yüksek çözünürlüklü ortofoto ile karşılaştırılarak belirtilerin tam yeri ortaya çıkarılmıştır ([Şekil 14](#)).



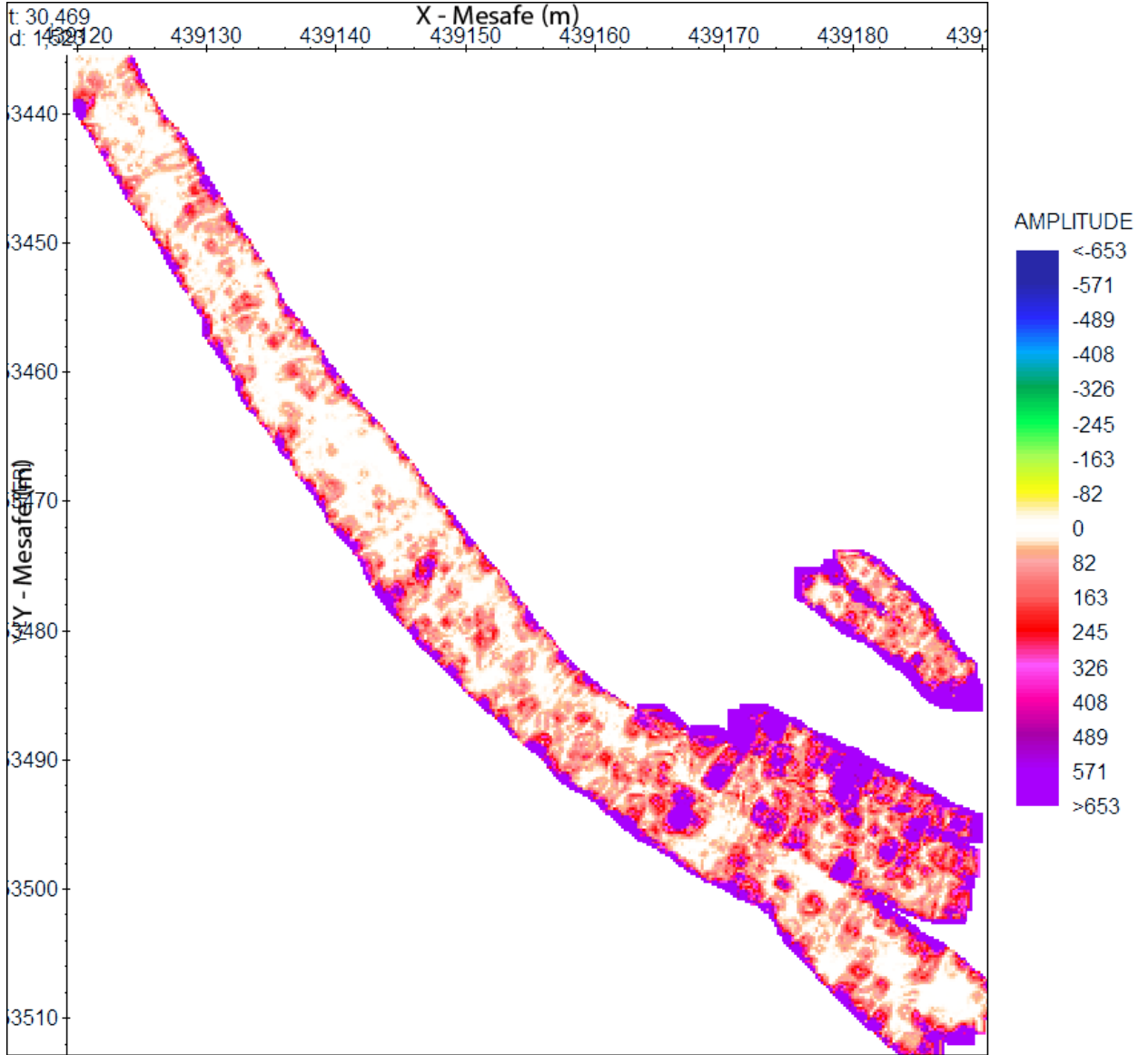


Şekil 11. Lone Pine çalışma alanında elde edilen yeraltı radarına (GPR) ait verilerin tüm derinliklerde gösterimi (koyu renkli alanlar belirtilere karşılık gelmektedir).



Şekil 12. Lone Pine çalışma alanında elde edilen yeraltı radarına (GPR) ait verilerin derinlik kesitlerinin gösterimi (koyu renkli alanlar belirtilere karşılık gelmektedir).





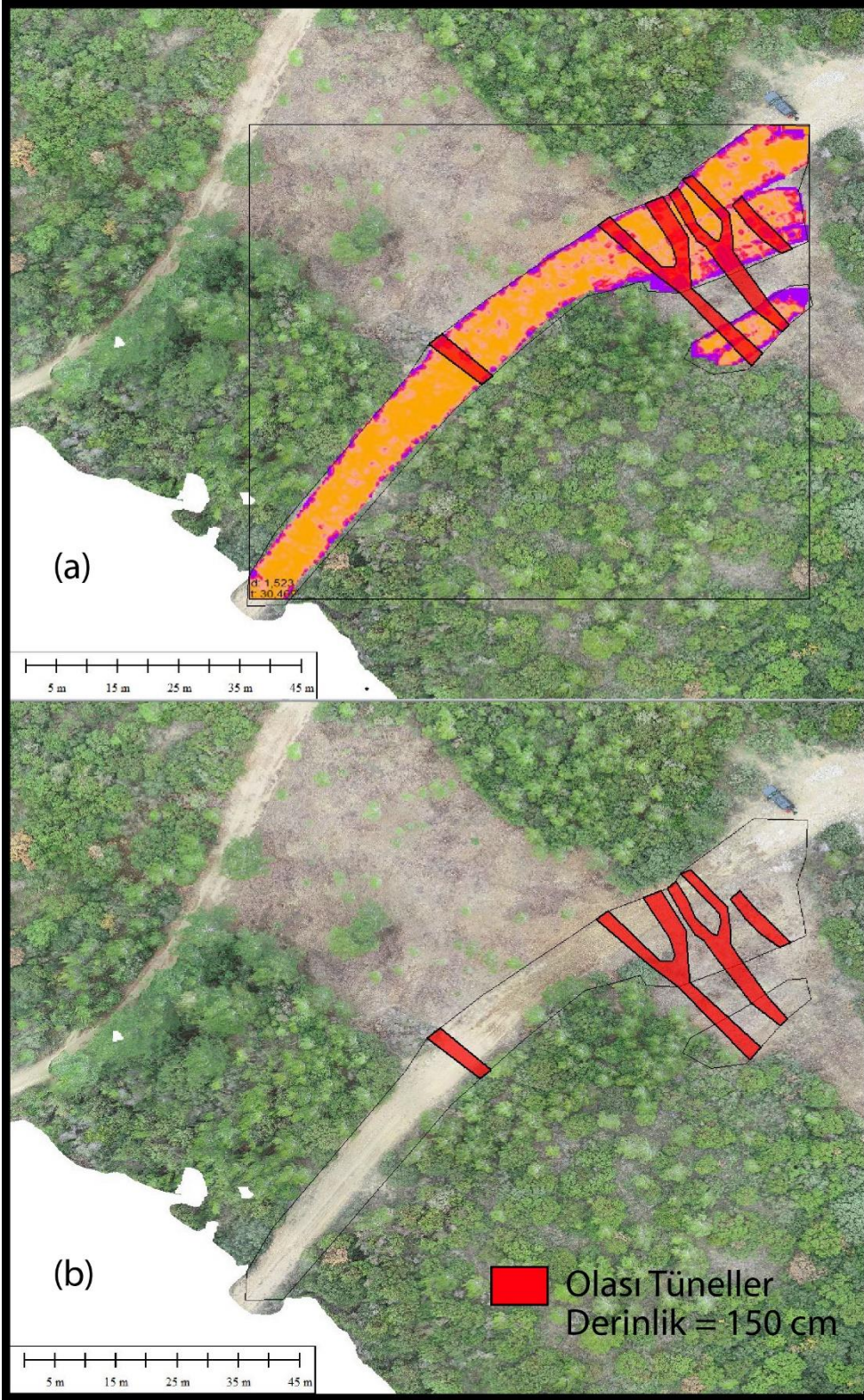
Şekil 13. Lone Pine çalışma alanında elde edilen yeraltı radarına (GPR) ait verilerin en iyi derinlik olan 150 cm derinlik gösterimi (koyu renkli alanlar belirtilere karşılık gelmektedir).



Şekil 14. Lone Pine çalışma alanında elde edilen belirtinin 150 cm derinde ortofoto üzerinde gösterimi (koyu renkli alanlar belirtilere karşılık gelmektedir).

Lone Pine olarak adlandırılan bölgede yapılan çalışmalar siperlerin haberleşmesinde kullanıldığı düşünülen tünel yapılarının yerlerinin araştırılmasına yönelik gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda bölgede yaklaşık 1100 m<sup>2</sup>'lik bir alanda ölçüm gerçekleştirilmiştir ([Şekil 5c](#)). Saha koşulları nedeni ile (yüksek eğim ve bitki örtüsü) daha geniş bölgelerin ölçümleri yapılamamıştır. Buna rağmen tünel yapısı olduğu düşünülen yapılar 150 cm derinlikte belirlenmiştir ([Şekil 15](#)).





Şekil 15. Lone Pine ölçüm bölgesinde elde edilen sonuçların gösterimi. (a). Yeraltı Radarı (GPR) verileri üzerine belirtilerin yerleştirilmiş görüntüsü. (b) Belirlenen bulgunun ortofoto üzerinde gösterimi.

## 5. Sonuçlar

Proje sürecinde belirlenen iki farklı çalışma bölgesinde de sonuçlara ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar daha önceki bilgilere katkı sağlamakla beraber tarihin önemli bir yerini tutan Çanakkale savaşlarının geçtiği bu alanlarda bilinmeyenlere ışık tutulmuştur. Çalışma genel olarak tüm alanlarda İHA görüntüleri ile elde edilen sayısal yükseklik modeli ve ortofotolar üzerinden yapılan yer belirleme işlemleri ile başlamıştır. İHA uçuşları sayesinde gözle yerden belirlenemeyen yapısal birçok unsur (siper, çukur vb.) modellerde belirlenmiştir. Aynı zamanda yüksek hassasiyetli GPS ile uygulanan yeraltı radarı (GPR) ölçümlerinde de altlık olarak kullanılmıştır. Şahindere Şehitliği çevresinde yapılan çalışmalar ile ölçüm yapılan her alanda “Olası Şehitlik” diye tanımlanabilecek belirtiler yaklaşık 240 cm derinlikte karşımıza çıkmıştır. Lone Pine olarak adlandırılan bölgede yapılan çalışmalarda ise siperlerin haberleşmesinde kullanıldığı düşünülen tünel yapılarının yerlerinin araştırılmasına yönelik gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda ise, tünel yapısı olduğu düşünülen yapılar 150 cm derinlikte belirlenmiştir. Çanakkale savaşlarını geçti bölge olan Gelibolu Yarımadası sınırları içerisinde gerçekleştirilen yüksek hassasiyetli Jeofizik ve uzaktan algılama çalışmaları sonucunda daha önce hakkında bilgi az ya da olmayan konulara ışık tutulmuştur. Proje kapsamında alanın genişliği nedeni ile sadece 2 farklı lokasyonda gerçekleştirilen çalışmalar hedeflenen amaca ulaşmıştır. Koordineli olarak multi-disipliner yürütülen bu çalışmanın devamı olacak çalışmalarda, bu çalışmanın izinde seçilecek yeni alanlar araştırılarak daha fazla bilinmeye ışık tutmak mümkün olacaktır.

## Teşekkür

Bu çalışma, FBA-2018-2485 numaralı ÇOMÜ-BAP projesi ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

## Yazar Katkıları

Cahit Çağlar Yalçın: Saha çalışmaları ve elde edilen verilerin işlenip yorumlanması kısmında görev almıştır. Ayrıca makaleyi yazmıştır.

Yunus Can Kurban: Saha çalışmaları ve elde edilen verilerin işlenip yorumlanması kısmında görev almıştır.

Erdem Gündoğdu: Saha çalışmaları ve elde edilen verilerin işlenip yorumlanması kısmında görev almıştır.

Mehmet Ali Yücel: Saha çalışmaları ve elde edilen verilerin işlenip yorumlanması kısmında görev almıştır.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## Kaynaklar

- Annan, A.P., Waller, W.M., Strangway, D.W., Rossiter, J.R., Redman, J.D., & Watts, R.D. (1975). The electromagnetic response of a low-loss, 2-layer, dielectric earth for horizontal electric dipole excitation. *Geophysics*, 40(2), 285-298. <https://doi.org/10.1190/1.1440525>
- Annan, A.P., & Cosway, S.W. (1992). Ground Penetrating Radar Survey Design. *5th EEGS Symposium on the Application of Geophysics to Engineering and Environmental Problems*.
- Büyüksaraç, A., Bektaş, O., Tulunay, E., & Ateş, A. (2013). Identification of buried archaeological substances using derivatives of magnetic anomalies in Nif (olympus) Mountain, West Anatolia, *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 13(1), 1-8. <http://maajournal.com/Issues/2013/Vol13-1/FullTextBuyua2.pdf>
- Büyüksaraç, A., Sayılır, B., Yalçın C.Ç., Bektaş, Ö., Kurban, Y. C., & Topçu, M. İ. (2014). Geophysical Investigation of Buried Cannons in Kumkale (dardanelles), Turkey. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 14(1), 291-299. [DOI:10.13140/RG.2.1.4663.1764](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4663.1764)
- Conyers, L. B. (2004). *Ground-penetrating Radar for Archaeology*. Altamira Press, Walnut Creek, California.



- Daniels, D. J., 2004. Ground Penetrating Radar 2nd Edition, published by the IEE Radar, Sonar, *Navigation and Avionics Series*, London, United Kingdom.
- Gil, E., Mas, Á., Lerma, C., Torner, M. E., & Vercher, J. (2019). Non-destructive Techniques Methodologies for the Detection of Ancient Structures under Heritage Buildings, *International Journal of Architectural Heritage*. <https://doi.org/10.1080/15583058.2019.1700320>
- Johnston, B., Ruffell, A., McKinley, J., & Warke, P. (2018). Detecting voids within a historical building facade: A comparative study of three high frequency GPR antenna, *Journal of Cultural Heritage*, 32, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2018.02.003>
- Kanli, A.İ., Taller, G., Nagy, P., Tildy, P., Pronay, Z., & Toros, E. (2015). GPR survey for reinforcement of historical heritage construction at fire tower of Sopron. *Journal of Applied Geophysics*. Volume. 112, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.jappgeo.2014.11.005>
- Leucci, G., Masini, N., Persico, R., & Soldovieri, F. (2011). GPR and sonic tomography for structural restoration: the case of the cathedral of Tricarico, *Journal of Geophysics and Engineering*, 8, 76–92.
- Leucci, G., Masini, N., & Persico, R. (2012). Time-frequency analysis of GPR data to investigate the damage of monumental buildings, *Journal of Geophysics and Engineering*, 9, 81–91. <https://doi.org/10.1088/1742-2132/9/4/S81>
- Martínez-Garrido, M. I., Fort, R., Gómez-Heras, M., Valles-Iriso, J., & Varas-Muriel, M. J. (2018). A comprehensive study for moisture control in cultural heritage using non-destructive techniques, *Journal of Applied Geophysics*, 155, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.jappgeo.2018.03.008>
- Ming-Chih, L., Yu-Ming, K., Kun-Fa, L., & Hui-Chi, H. (2009). A study on the technologies for detecting underground water level and processing image, *International Journal of Applied Science and Engineering*, 7(1), 61–68.
- Moropoulou, A., Labropoulos, K., Delegou, E.T., Karoglou, M., & Bakolas, A. (2013). Non-destructive techniques as a tool for the protection of built cultural heritage, *Construction and Building Materials*, 48, 1222–1239. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2013.03.044>
- Persico, R., Ciminale, M., & Matera, L. (2014). A new reconfigurable stepped frequency GPR system, possibilities and issues; applications to two different cultural heritage resources, *Near Surface Geophysics*, 12, 793–801. <https://doi.org/10.3997/1873-0604.2014035>
- Yalçın, C. Ç., Bano, M., Kadioglu, M., Karabacak, V., Meghraoui, M., & Altunel, E. (2009). New temple discovery at the archaeological site of Nysa (western turkey) using gpr method, *Journal of Archaeological Science*, 36(8), 1680-1689. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.12.016>.
- Yalçın, C. Ç. (2012). 2-D and 3-D Diffraction Stack Migration Method to Detect Clandestine Cemetery Using GPR: A Case Study in Çanakkale (Turkey), *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 12, 123-130. <http://maajournal.com/Issues/2012/pdf/Full7.pdf>
- Yalçın, C. Ç., Kurban, Y. C., & Altunel, E. (2017). Research using GPR into the cause of cracks and depressions in the floor of the gallery of Hagia Sophia Museum. *Construction and Building Materials*. 139, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.02.036>
- Yalçın, C. Ç., Büyüksaraç, A., & Kurban, Y.C. (2019). Non-destructive damage analysis in Kariye (Chora) Museum as a cultural heritage building. *Journal of Applied Geophysics*, 171, 103874. <https://doi.org/10.1016/j.jappgeo.2019.103874>
- Yücel, M. A., Yücel, D. S., Yalçın, C. C. ve Yılmaz, D. (2018). 3D Modelling Of Historical Remains Using Unmanned Aerial Vehicle, A Case Study: Gallipoli Peninsula. *XXVIII International Symposium on Modern Technologies, Education and Professional Practice in Geodesy and Related Field*, Sofia, Bulgaria, 8-9 November 2018, 101-107.



# Characterization of Asbestos in Ambient Air During Refractory Material Production from Magnesite Ore

Mehmet Ali Kucuker<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, İzmir Institute of Technology, Urla-İzmir, Turkey

## Article History

Received: 12.05.2021

Accepted: 25.08.2021

Published: 20.09.2021

## Research Article


**Abstract** – Asbestos is a general term employed for crystallized silicate minerals in fibril form. It can be commonly found in nature and from which fibre uses in the industry through processing are obtained. However, there is limited information about the air quality in terms of asbestos for the companies that produce refractory materials from magnesite ore. This deficiency in the literature can be eliminated with this study for a company with high quality and durable refractory materials. Among the most used asbestos analysis are scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscope (TEM). Asbestos analyses have been performed in two different institutions on the parallel samples whose preliminary processes have been completed. According to the SEM results, 23 of the observed fibrils in a total area are bigger than 5 µm in lengths and less than 3 µm in width. Three of fibrils were observed to have the characteristics of chrysotile fibres morphemically and elementally. In addition, airborne samples were analyzed using a TEM instrument. According to the results obtained, 13 of the observed fibrils in total were bigger than 5 µm in length and less than 3 µm in width and based on Electron Diffraction analysis and elemental composition (EDXA) results of these fibrils, and they were not observed to have the characteristics of chrysotile fibres. Most of the observed fibrils were noted to be other inorganic minerals (lizardite) fibrils. Additionally, the obtained results show that the asbestos concentration in the air is below the limit specified by the provision (0.1 fiber/cm<sup>3</sup>).

**Keywords** – Asbestos, ambient air, magnesite ore, morphologic analysis

## 1. Introduction

Assessment of occupational exposure to air pollutants in workplaces has an essential place in worker health and safety programs (Melville & Lippmann, 2001; Marioryad et al., 2011). In the last few decades, there has been a growing interest in determining the harmful effects of inorganic fibrils in the air of the working environment on human health. In addition, another concern is to find the source of these air pollutants and to minimize the exposure. One of the most dangerous inorganic fibres is asbestos group fibrils in the workplaces. Asbestos is a general term employed for crystallized silicate minerals in fibril form, commonly found in nature. From which fibre to be used in industry through processing is obtained. Its significance for the industry is that it is resistant against heat, friction, acidic, and alkaline. It has a high-tension resistance. It is dielectric, and fibrous have an elastic feature. It is vital to investigate whether such inorganic fibrils are present in the air around the working environment.

For this reason, the air quality of the working environment is constantly examined in many industrial establishments. According to the literature, it has been noticed that asbestos and its derivatives are observed in the working air of some industrial activities. However, there is limited information about the air quality in terms of asbestos for the companies that produce refractory materials from magnesite ore. In order to eliminate this deficiency in the literature, it was aimed to characterize the fibers by performing an asbestos analysis using

<sup>1</sup>  mehmetalikucuker@iyte.edu.tr

\*Corresponding Author

SEM and TEM in the ambient air in the factory of a company that produces high quality and durable refractory materials from magnesite ore for the iron and steel industry in Turkey. Additionally, this is the first record study on the determination of the asbestos in the ambient air of the reflector material production from magnesite ore.

### 1.1. Magnesite Ore and Refractory Material Production

Magnesium (Mg) is an alkaline earth element and one of the most abundant elements in the earth's crust (Erdoğan and Yıldız, 1995). Due to the high affinity of the Mg to oxygen, it is coated with a matt-coloured oxide layer in the ambient air. Because of this feature, MgO (Magnesia), which is formed by the element Mg with oxygen, is used to produce refractory materials. It does not melt up to 2800 °C, and it can maintain its solid structure at high temperatures (Erdoğan and Yıldız, 1995). The most important source of magnesia is magnesite (MgCO<sub>3</sub>), a magnesium carbonate mineral. It is common in nature and theoretically contains 52.3% CO<sub>2</sub>, 47.7% MgO and a limited amount of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; its hardness is between 3.4 and 4.5. It is a mineral with a specific gravity of 2.9-3.1 (Erdoğan and Yıldız, 1995). Sinter magnesite is produced from magnesite ore to be used in quality and durable refractory materials, mainly for the iron and steel industry.

### 1.2. Asbestos Effects on Human Health

According to the World Health Organization, approximately 125 million people are exposed to asbestos at workplaces worldwide (WHO, 2007). It can result in asbestos-related diseases such as lung cancer, mesothelioma, or asbestosis (Park, 2018). Several factors are listed as an asbestos concentration in the ambient air, the exposure time, size and type of the fibers, functional and anatomical conditions of exposed employers, and the respiratory rate associated with physical exertion for the health hazard of asbestos (Rodilla et al., 2021). The previous studies figure out the most significant risk exists with exposure to amphibole fibers, followed by mixed fibers (amphibole and chrysotile), and finally, chrysotile (Rodilla et al., 2021). In addition, the risk of asbestos in the air bases on the type of asbestos, the physicochemical characteristics of these fibers, the intensity of exposure and, for some pathologies, co-exposures with other carcinogens (Rodilla et al., 2021). Therefore, these factors should be considered while measuring the asbestos health effects. On the other hand, the governments or unions have been lowered the exposure limit values in order to protect workers' health year by year.

### 1.3. Regulations Regarding to Asbestos

When the European Union (EU) regulations are examined, there are primarily two European Union Directives concerning asbestos. The first regulation is the European Union Directive 83/477/EEC covering the measures intended for work health and safety in workplaces where asbestos or asbestos-related materials are used (EU, 1983). The existing member country legislation designed to protect workers against asbestos in European Union countries have been prepared upon considering European Union Directive 83:477:EEC dated 19 September 1983 (EU, 1983). To strengthen the "controlled use" regime, council directives 91/383/EEC dated 25.06.1991 (EU, 1991), 2003/18/EEC dated 27.03.2003 (EU, 2003) and 2009/148/EC dated 30.11.2009 (EU, 2009) that prescribes amendments in the said directive have been issued and adapted. Some of those amendments have allowed the safe use of asbestos products by following specific procedures. The second one is the European Union Directive 76/769/EEC (EU, 1976) covering the provisions regarding asbestos use and marketing. Regulations regarding asbestos in Turkey can be listed as follows:

- "Guidelines Regarding the Measures to be Taken Inflammable, Explosive, Hazardous and Harmful Works and Workplaces" was adopted pursuant to the article 74 of Labor Law number 1475 and was published on the Official Gazette 14752 dated 24.12.1973 (APTSR, 2005).
- "Regulations on Controlling Harmful, Hazardous Substances and Products" adopted by Environmental Ministry that was published on Official Gazette number 21634 dated 11.07.1993 as well as the regulations which prescribed amendments in the laws (APTSR, 2005).

- “Regulations on Health and Safety Measures Intended for Workers Working with Asbestos” adopted according to article 30 of Labor Law number 6331 and which was published on Official Gazette number 28539 on 25.01.2013. According to article 11 of those regulations, the provision stating “Employer shall make sure that eight hours time-weighted average (ZAOD-TWA) value of asbestos concentration in the air to which the workers are subjected shall not exceed 0,1 fiber/cm<sup>3</sup>” is valid (ACSGOHY, 2013).
- “Regulation on Restriction and Prohibition of Hazardous Substances and Mixtures” which is intended for the prohibition of the manufacture and use of asbestos that is causing cancer as well as the marketing of asbestos-containing goods and that was published in Official Gazette number 29182 dated 21.11.2014 (ZMKKYHY, 2014) has been reissued upon taking into consideration of the 17th attachment regarding the limitations on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals Regulations regarding the Registration, Evaluation, Permission and Limitation of Chemicals pursuant to the European Union Parliament and Council number 1907/2006/EC (EU, 2006) and was published on the Official Gazette number 27687 dated 29 August 2010. Thus, reissued regulations have entered into force as of 31 December 2010. According to the third paragraph of (A) section under the heading “1. Provisions regarding Asbestos” in the Attachment 1 of the Regulations it is stated that “Chrysotile asbestos (white asbestos) fibers cannot be extracted, manufactured, used in the manufacture of any other products or for any other purposes, and cannot be marketed with the intention of sale or use” (ZMKKYHY, 2014).

## 2. Materials and Methods

In determining the method, the sample type to be analyzed and the analysis device used are considered essential matters. Among the most commonly used devices in asbestos measurement are scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM). Boğaziçi University Environmental Sciences Institute performed sampling from ambient air through using ISO 14966 "Ambient air — Determination of numerical concentration of inorganic fibrous particles — Scanning electron microscopy (SEM) method" and asbestos analysis has been conducted with SEM instrument consistent with the said method (ISO 14966, 2002). Asbestos analysis in the samples obtained from ambient air has been performed in accordance with ISO 13794 “Ambient air — Determination of asbestos fibres — Indirect-transfer transmission electron microscopy (TEM) method” by RJ Lee Group in the USA through using a TEM instrument as well (ISO 13794, 1999).

### 2.1. Sampling

Sampling from ambient air for asbestos analysis was performed to simulate the exposure of workers to the dust caused by asbestos or asbestos-containing materials. The opinions of the workers and representatives were taken while obtaining samples, and the sampling points were determined in line with such opinions. Four airborne sampling points were chosen: *i*) pre-treatment and size reduction plant; *ii*) despatch area; *iii*) production plant; and *iv*) storage yard. Air samples for determining the asbestos rate in ambient air were taken using three-piece disposable special filters (capillary-pore polycarbonate filter) in 25 mm diameter and having 0.8 µm pore size upon taking into consideration the 8 hours work shift. Sample taking filters have been placed on filter fixers adjustable to 1.5 meters from the ground (Figure 1), and sampling has been performed for 8 hours at the flow rate of 8 L/min by the flow rate adjustable vacuum pump. Two parallel samples and a total of 8 samples were taken for minimizing test shortcomings.



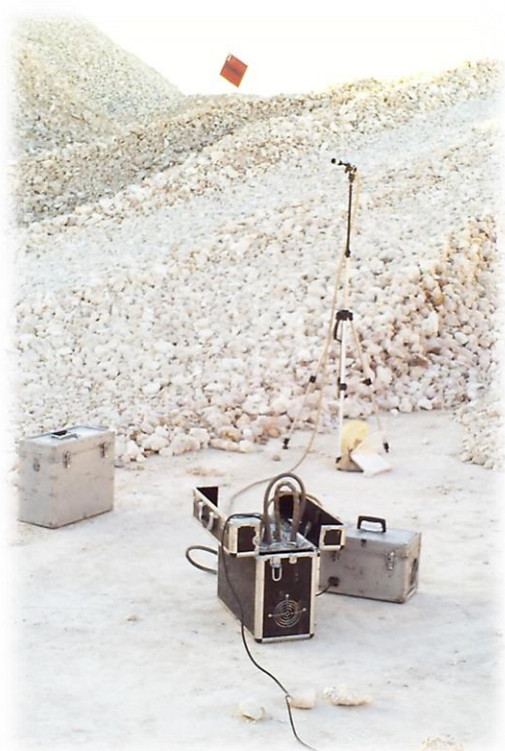


Figure 1. Sampling from ambient air in the stockyard

## 2.2. Preparation of Samples for Analysis

Obtained samples from ambient air have been sent to the US accredited RJ Lee laboratories, where they have been taken to a preliminary process. The samples were kept at 480 °C temperature for 6 hours through plasma asher by RJ Lee and thus, water and inflammable substances were eliminated in the filter. After ashing, the filter was rid of acid and soluble substances by being cleaned with 30% diluted hydrochloric acid (HCl). Sample preparation includes ashing and dispersion of the collected particles. Thanks to these processes, all asbestos that had entered the material particles or particle agglomerates were measured. The pre-treated ambient air sample was divided into two equal parts in RJ Lee laboratories. The first part was analyzed at Boğaziçi University - Advanced Technologies Central Laboratories, the second part was analyzed in RJ Lee Group Laboratories. Parallel samples have been used in each analysis.

## 2.3. Asbestos Analysis Using SEM Instrument

Determination of the type of inorganic fibrils in the ambient air and their numerical concentration were performed at Boğaziçi University laboratory according to ISO 14966 method and by using SEM. In this method, fibers whose length is more than 5 microns and width is less than 3 microns, and with a size 3 times more than the width have been taken into consideration. During the analysis accelerating voltage of the scanning electron microscope (SEM) was adjusted as 20kV. The scanning process of the sample was performed at the magnification in the rate of 2000 X and 20000 X depending on the observed fibril sizes. In the analysis performed according to the ISO 14966 method with SEM, the detection limit was determined as 300 fiber/m<sup>3</sup> on the scanning area of 1 mm<sup>2</sup> filter (ISO 14966, 2002). Approximately an area of 1 mm<sup>2</sup> has been scanned on the filter, and the fibril concentration of counted fibrils has been determined by using the formula (Equation 2.1) given below (ISO 14966, 2002). Since the pre-treated sample was divided into three parts, the result was multiplied by the verification factor. Verification factor was found through the multiplication of the rate remaining from the sample, which was subject to preliminary process and the parts of samples allocated for laboratories and then dividing the same by the dilution factor. Chemical compositions

(elemental analysis) of the observed fibrils through energy dispersive X-rays analysis (EDXA) were determined and classified as asbestos fibrils, calcium sulphate fibrils, and other inorganic fibrils.

$$\text{Fibril Concentration (f/ml)} = \frac{\text{Number of Counted Fibrils}}{\text{Analyzed Area (mm}^2\text{)}} \times \frac{\text{Filter Area (mm}^2\text{)}}{\text{Vacuumed Air Amount (ml)}} \times \text{Verification Factor} \quad (2.1)$$

#### 2.4. Asbestos Analysis using TEM Instrument

Determination of types and numerical concentration of inorganic fibrils present in the ambient air according to ISO 13794 method by using a transmission electron microscope (TEM) were performed by RJ Lee Group laboratories in the USA. TEM sample grids were examined in low and high magnification powers and quantitative fibril count were performed in the randomly selected grid openings. The lowest detection limit for the scanned area of TEM samples is checked by total suspended particles concentration after ashing and watery phase distribution processes. This depends on the chemical properties of the dispersed particles (ISO 13794, 1999). The atmosphere whose total suspended particle concentration is approximately  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  is equivalent to a clear countryside atmosphere. If it is assumed that 4000 liters of the air have been filtered, an analytical accuracy of 0.5 structure/L is reached. And the examined area of  $0.195 \text{ mm}^2$  in TEM samples is equivalent to the detection limit of 1.8 structure/L (ISO 13794, 1999). The fibril concentration of the counted fibrils has been determined by using the equation 2.1. Since the obtained sample were divided into three parts, the result was multiplied by verification factor. Verification factor is found through multiplication of the rate remaining from the sample which was subject to preliminary process and the parts of samples allocated for laboratories and then dividing the same by the dilution factor.

In TEM analysis, electron diffraction (ED) was used to examine the crystal property of fiber, and energy-dispersive X-ray analysis (EDXA) was used to determine the elemental composition. Fiber classification process, order and morphological examination of fiber are based on electron diffraction pattern in a specific area and the qualitative and quantitative energy dispersive X-ray analysis. Identification and verification of chrysotile were only performed by quantitative ED, whereas the identification and validation of amphibole were performed by quantitative EDXA and quantitative zone axis ED (Atabey, 2009). Fiber classification was also performed.

#### 2.5. Classification of the Observed Fibers

Asbestos analyses are being performed by using different instruments. In this study, the same samples have been analyzed using appropriate standard methods in other analysis devices, and the differences have been presented.

##### 2.5.1. Morphological Classification

The observed fibers are separated into two classes: tube-shaped and non tube-shaped in terms of their morphological structures (Deer et al., 2009). Electron Diffraction (ED) is an electron microscope technique where the crystal feature of the sample is examined. Each fiber is further analysed by using energy dispersive X-ray analysis (EDXA) techniques. The following methods should be used when fibers are examined through ED and EDXA techniques (ISO 13794, 1999; Rees et al., 2001; Deer et al., 2009). Crystal properties of some mineral fiber such as chrysotile are easily damaged due to the high current density required for EDXA examinations. For this reason, ED examination should be completed before the EDXA spectrums of such fibers are taken. In the examination of more stable fibers such as amphibole ED or EDXA may be used in the same priority (Deer et al., 2009).

ED technique may be qualitative or quantitative. TEM device and ED technique are used for asbestos analyses. Qualitative ED involves visual inspection of the general characteristics of ED design achieved from a randomly directed fiber on a TEM monitor screen without detailed measurements (Deer et al., 2009). ED patterns

obtained from such fibers with cylindrical symmetry as chrysotile do not change when they are bent around their axis, and the patterns obtained from randomly directed fibers of such minerals can be interpreted quantitatively. For lizardite that does not have cylindrical symmetry, if the fiber is only directed towards the main crystallographic axis which runs parallel to the electron beam, then the ED patterns thus obtained can be interpreted quantitatively (Deer et al., 2009). Structural demonstration of standard chrysotile, lizardite and antigorite fibrils are shown in Figure 2.

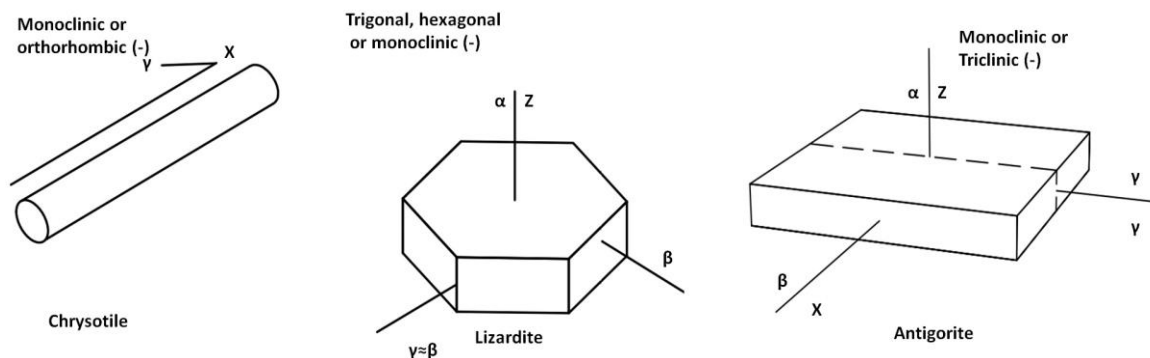


Figure 2. Structural forms of chrysotile, lizardite and antigorite fibers (adopted and redrawn from Deer et al., 2009).

### 2.5.2. Classification According to Elemental Composition

Interpretation of EDXA spectrum can be qualitative or quantitative. For qualitative interpretation of a spectrum, the peaks of X rays resulting from elements inside the fiber are recorded. For a quantitative interpretation, after the ground extraction has been made, clear peak areas are obtained out of X-ray peaks resulting from the elements inside fibers. This method allows a quantitative interpretation to be made for mineral containing silicon as well (Cossette & Delvaux, 1979). In order to obtain an EDXA spectrum, the view of a fiber is moved towards the center of the screen, and the objective gap is zoomed out. An appropriate electron beam diameter is selected, and it is turned in a way as to collide into fiber beam. Depending on the device, it may be necessary to bend the sample towards the X-ray detector. It may be required to use Scanning Transmission Electron Microscope (STEM) process type in some devices. The time required to obtain a suitable spectrum varies based on fiber diameter and factors regarding the device (ASTM, 2002). For a quantitative interpretation, a statistically valid number of counts should be present for each peak. The analyses of sodium-containing fibers with small diameters are critical because such fibers are located in the lowest energy range for which the X-ray detector is less sensitive. In order to detect the existence of sodium in such fibers, the spectrum should be taken in a sufficiently long time period (Cossette & Delvaux, 1979). The data obtained from the EDXA analyses the observed fibrils in SEM and TEM analyses. The Chrysotile, Amosite, Crocidolite, Anthophyllite, Tremolite and Actinolite values (%) prepared based on reference asbestos minerals in Table 1 have been taken from ISO 14966 standard method (ISO 14966, 2002). The elemental composition values for lizardite have been quoted from "Rock-forming minerals: Layered silicates excluding micas and clay minerals" and thus included in Table 1 (ISO 14966, 2002; Deer et al., 2009).

Table 1

Elemental data of asbestos fibrils (ISO 14966, 2002; Deer et al., 2009).

	Chrysotile	Amosite	Crocidolite	Antophyllite	Tremolite	Actinolite	Lizardite
SiO <sub>2</sub> (%)	36 to 44	49 to 53	49 to 56	53 to 60	55 to 60	51 to 56	39 to 42
MgO (%)	38 to 42	1 to 7	0 to 3	17 to 34	20 to 26	12 to 20	39 to 43
FeO (%)	0 to 3	34 to 44	13 to 21	0 to 20	0 to 5	5 to 15	0 to 2
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	0 to 5	0 to 5	13 to 20	0 to 5	0 to 5	0 to 5	0 to 3
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	0 to 2	0 to 1	0 to 1	0 to 3	0 to 3	0 to 3	0 to 1
CaO (%)	0 to 2	0 to 2	0 to 3	0 to 3	10 to 15	10 to 13	0 to 1
K <sub>2</sub> O (%)	0 to 1	0 to 1	0 to 1	0 to 1	0 to 1	0 to 1	0 to 1
Na <sub>2</sub> O (%)	0 to 1	0 to 1	4 to 9	0 to 1	0 to 2	0 to 2	0 to 1
H <sub>2</sub> O (%)	12 to 14	2 to 5	2 to 5	1 to 6	1 to 3	1 to 3	12 to 13

In the interpretation of fibril analysis, chrysotile's morphological structure is characteristic and can be easily understood through experience. However, a few minerals with similar appearance and morphological observation are insufficient for most samples (ISO 13794, 1999). If the determined characteristics of the pattern correspond to those obtained from reference chrysotile, then the ED pattern obtained from chrysotile is highly characteristic of that mineral. However, the crystal property of fiber could be damaged due to various factors, and it may not provide an ED pattern. In that case, elemental composition (EDXA spectrum) could be the only relevant data added to the morphological observation (ISO 13794, 1999).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Analysis of Ambient Air Samples Using SEM

The samples collected from ambient air were analyzed using a scanning electron microscope (SEM) at the Advanced Technologies R&D Central Laboratory of Boğaziçi University. The methods obtained were evaluated considering the chemical and structural (morphological) characteristics of the asbestos fibers as contained in methods and reference books. The analyses conducted with an SEM instrument on 2 parallel samples (Airborne 1 and Airborne 2) collected from ambient air are summarized in Table 2. Figure 3 shows the 3 chrysotile fibrils observed by the analyses. Chrysotile fibrils of the samples collected from ambient air are shown together with EDXA results. Figure 4 shows example images of another inorganic mineral (lizardite) fibrils observed by the analysis of ambient air.

Table 2

SEM analysis results of the samples collected from ambient air

Sample Code	Verification	Analyzed Area, mm <sup>2</sup>	Number of Fibrils Observed		Asbestos Concentration *	
			Chrysotile	Other	s/mm <sup>2</sup>	s/ml
Airborne 1	0.7666	1	1	80 (13)	<0.76	<0.00001
Airborne 2	0.7965	1	2	75 (10)	<1.6	<0.00004

\* Concentration calculation was made according to the conditions of the sample received

“<” indicates that the concentration is lower than the determination limit

“( )” indicates the number of the fibrils bigger than 5 μm

In light of the data obtained, the observed fibrils were analyzed both morphologically and elementally. The tubular shape, which is the morphologic structure of the chrysotile, was determined in the fibrils observed as a result of the analysis.



In the elemental compositions obtained as a result of the EDXA analyses of the chrysotile fibers, the percentage of SiO<sub>2</sub> is observed to be between 40 and 44, and the ratio of MgO is observed to be between 38 and 42. These values match the elemental data of the chrysotile fibers as given in [Table 1](#).

Other inorganic mineral (lizardite) fibers were found among the fibrils observed by the analyses conducted with an SEM instrument on the samples collected from ambient air. The lizardite fibrils observed as a result of the investigation were determined to have a morphologically planar (flat) and stringy structure. In the elemental compositions obtained due to the EDXA analyses of other inorganic mineral (lizardite) fibers, the percentage of SiO<sub>2</sub> is observed to be between 39 and 42, and the percentage of MgO is observed to be between 39 and 43. These values match the elemental data of the lizardite fibers as given in [Table 1](#).

According to the Labor Law number 6331 and which was published on Official Gazette number 28539 on 25.01.2013 and article 11 of that regulations, the provision stating “Employer shall make sure that eight hours time-weighted average (ZAOD-TWA) value of asbestos concentration in the air to which the workers are subjected shall not exceed 0,1 fiber/cm<sup>3</sup>” is valid ([ACSGOHY, 2013](#)). The obtained results (0.00004 fiber/cm<sup>3</sup>) show that the asbestos concentration in the air is below the limit specified by the provision (0.1 fiber/cm<sup>3</sup>).

Since the equipment required to examine the crystal structure of the observed fibrils is not available in the SEM device, the crystal structures of the fibers could not be examined. For this reason, it is not sufficient to use the SEM device alone in such analyses.

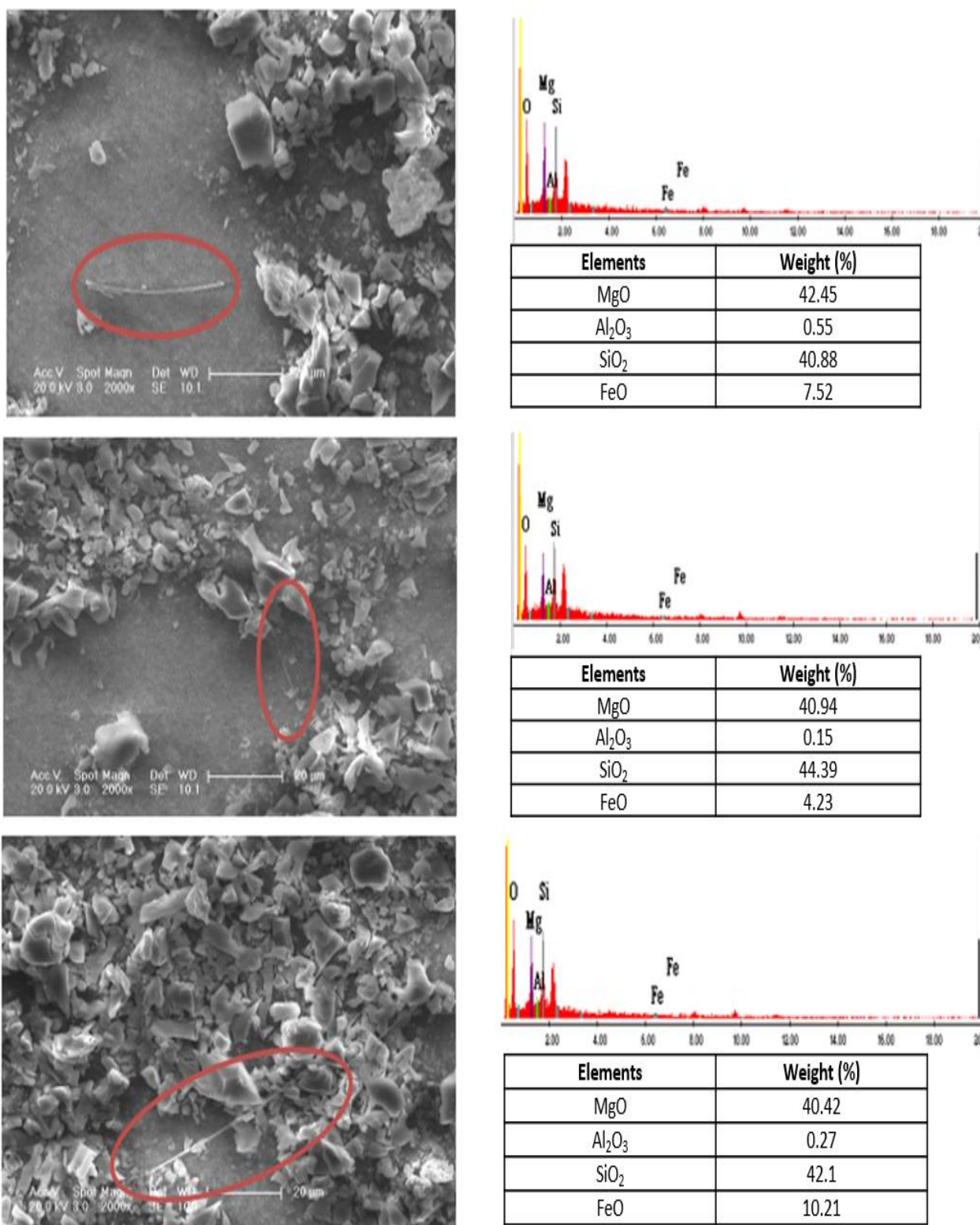


Figure 3. Chrysotile fibrils were observed in ambient air and their elemental analysis results.

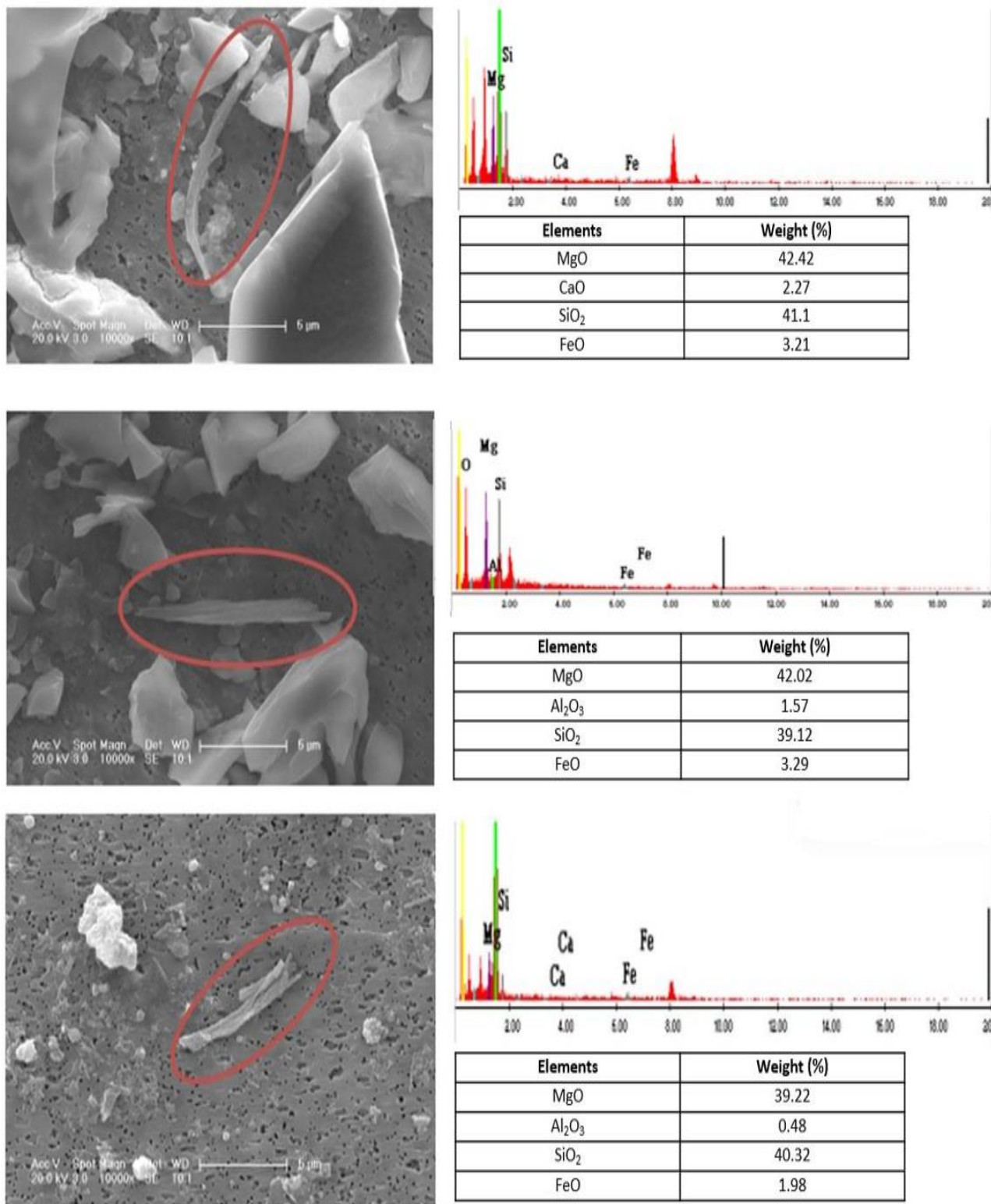


Figure 4. Other inorganic minerals (lizardite) fibrils were observed in ambient air and their elemental analysis results.

### 3.2. Analysis of Ambient Air Samples Using TEM

The samples collected from ambient air were analyzed with a transmission electron microscope (TEM) at RJ Lee Group Laboratory in the USA. The methods obtained were evaluated considering the chemical and structural (morphological) characteristics of the asbestos fibers as contained in methods and reference books. According to the TEM analysis results obtained from the samples collected from ambient air (Airborne 1 and Airborne 2), Chrysotile fibril was not observed as a result of the analysis. The detected fibrils were indicated to be other mineral (lizardite) fibrils. Results of the samples collected from ambient air analyzed using TEM are summarized in Table 3.

Table 3  
TEM analysis results of the samples collected from ambient air

Sample Code	Verification Coefficient	Analyzed Area, mm <sup>2</sup>	Number of Fibrils Observed		Asbestos Concentration *	
			Chrysotile	Other	s/mm <sup>2</sup>	s/ml
Airborne 1	4.089	0.09243	0	53 (2)	<44.2	<0.0044
Airborne 2	3.426	0.18504	0	102 (11)	<18.5	<0.0019

\* Concentration calculation was made according to the conditions of the sample received

“<” indicates that the concentration is lower than the determination limit

“( )” indicates the number of the fibrils bigger than 5  $\mu\text{m}$ .

According to EDXA analyses of the obtained fibrils, they were observed to be consistent with the spectrums of chrysotile and antigorite among the serpentine group minerals. In addition, the fibers are understood to have a magnesium silicate structure. Examples of the observed serpentine structures on Airborne 1 and Airborne 2 are shown in Figure 5. According to the results obtained, 13 of the fibrils observed as a result of the analysis in total were bigger than 5  $\mu\text{m}$  in length and less than 3  $\mu\text{m}$  in width and based on ED analysis and elemental composition (EDXA) results of these fibrils, and they were observed not to have the characteristics of chrysotile fibers. The majority of the observed fibrils were noted to be other inorganic minerals (lizardite) fibrils.

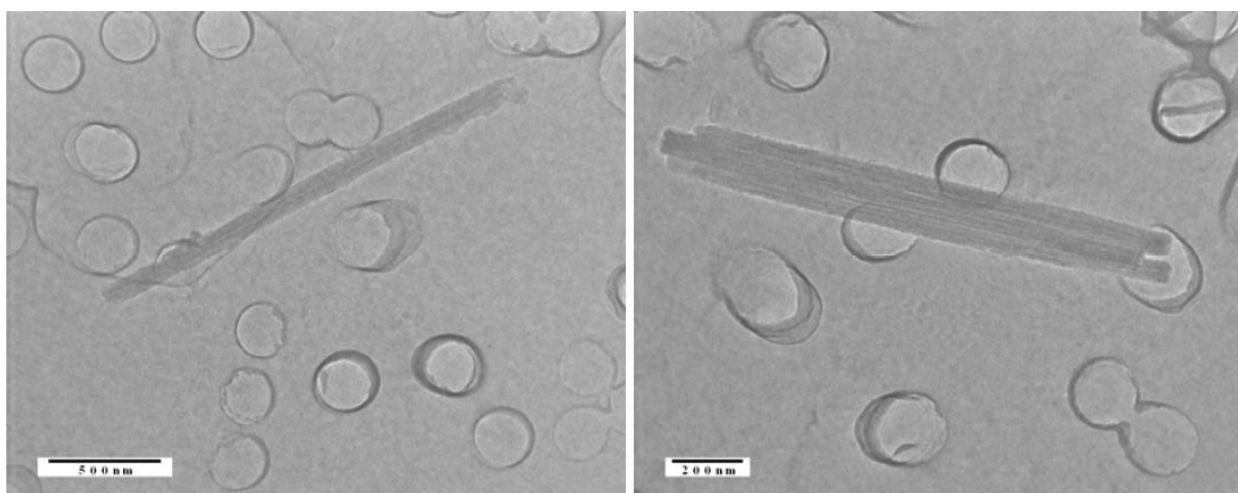


Figure 5. Typical serpentine structures were observed on samples.

Analyses with the TEM device give more reliable results in determining the types of fibrils observed. The most striking result of this study is that it is not correct to decide on the determination of asbestos types based on a single method or analysis device. The fibers should be determined by using appropriate methods and analysis devices with advanced image properties according to the sample type in such studies. On the other hand, since the detection limits of the SEM and TEM devices are different, it can be thought that the difference between the concentrations is related to this.



#### 4. Conclusion

Asbestos analysis was conducted on the samples obtained from ambient air using the SEM instrument at both Boğaziçi University Central Laboratory and RJ KLee Group. According to the results of the analyses conducted by Boğaziçi University, 23 of the fibrils observed in total are consistent with the phrase “bigger than 5 µm lengths and less than 3 µm in width”, as set out in the “Regulation on Health and Safety Measures for Those Working with Asbestos”. 3 of these fibrils were observed to have the characteristics of chrysotile fibers morphemically and elementally. Airborne samples were analyzed RJ Lee Group using TEM instrument as well. According to the results obtained, 13 of the observed fibrils in total were bigger than 5 µm in length and less than 3 µm in width and based on ED analysis and elemental composition (EDXA) results of these fibrils; they were observed not to have the characteristics of chrysotile fibers. Majority of the observed fibrils were noted to be other inorganic mineral (lizardite) fibrils. As a result of the asbestos analysis carried out on ambient air samples by SEM device according to the method no ISO 14966 by Boğaziçi University, asbestos concentration was found as 0.00004 fibre/cm<sup>3</sup>. RJ Lee Group carried out concurrent analyses according to ISO 13974 method by TEM. According to the analysis results obtained from the TEM device, asbestos concentration was 0.0004 fibre/cm<sup>3</sup>. All of these values are below the detection limit of the relevant analysis devices. Furthermore, they are below the limit specified by the provision “The employer shall ensure that 8-hour weighted average value (TWA) of the asbestos concentration in the air the workers are exposed to will not exceed 0.1 fibre/cm<sup>3</sup>” according to article 11 of The Regulation on Health and Safety Precautions in Those Working with Asbestos published in the Official Gazette dated 25.01.2013 and 28539 in force. In addition, the most significant result of this study is that it is not appropriate to make a decision on the determination of asbestos types based on a single method or analysis device.

#### Acknowledgement

The author wishes to thank Prof. Dr. Turgut T. Onay for the support.

#### Author Contributions

Mehmet Ali Kucuker: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing, Visualization.

#### Conflicts of Interest

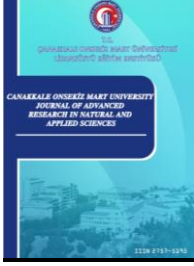
The author declares no conflict of interest.

#### References

- ACSGOHY, (2013). *Regulations on Health and Safety Measures Intended for Workers Working with Asbestos*, Official Gazette Official Journal number 28539 on 25.01.2013, Ankara. Retrieved from: <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=17050&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>
- APTSR, (2005). *Asbest veya Asbestli Malzeme ile Üretim Yapılan İşyerlerinde İş Sağlığı ve Güvenliği Proje Denetimi Sonuç Raporu*, T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, Ankara. Retrieved from: [https://ailevecalisma.gov.tr/medias/5974/2005\\_01.pdf](https://ailevecalisma.gov.tr/medias/5974/2005_01.pdf)
- ASTM, (2002). “Standard Test Method for Microvacuum Sampling and Indirect Analysis of Dust by Transmission Electron Microscopy for Asbestos Mass Concentration”, ASTM D5756, American Society for Testing and Materials, Conshohocken, PA.
- Atabey E. (2009). Türkiye de asbest, eriyonit, kuvars ve diğer mineral tozları ve etkileri. Maden Tetkik ve Arama Müdürlüğü, pp. 188.
- Cossette, M., & Delvaux, P. (1979). “Technical Evaluation of Chrysotile Asbestos Ore Bodies”, Short Course in Mineralogical Techniques of Asbestos Determination. R. L. Ledoux, ed., Mineralogical Association of Canada, pp. 79–110.
- Deer, W. A., Howie, R. A. & Zussman J. (2009). *Serpentines, Rock-forming minerals: Layered silicates*

- excluding micas and clay minerals, Vol. 3B, *John Wiley & Sons, New York*, pp. 157–211. Retrieved from: <https://pubs.geoscienceworld.org/canmin/article-abstract/48/5/1319/127220/>
- Erdoğan, N., & Yıldız, R., (1995). Magnezit ve Bazik Refrakter Malzeme Teknolojisi, Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/279537853>
- EU, (1976). Official Journal of the European Union. Council Directive 76/769/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations [Accessed 2021 July 21]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A31976L0769>
- EU, (1983). Official Journal of the European Union. Council Directive 83/477/EEC of 19 September 1983 on the protection of workers from the risks related to exposure to asbestos at work (second individual Directive within the meaning of Article 8 of Directive 80/1107/EEC) [Accessed 2021 July 21]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A31983L0477>
- EU, (1991). Official Journal of the European Union. Council Directive 91/383/EEC of 25 June 1991 supplementing the measures to encourage improvements in the safety and health at work of workers with a fixed- duration employment relationship or a temporary employment relationship) [Accessed 2021 July 21]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A31991L0383>
- EU, (2003). Official Journal of the European Union. Council Directive 83/477/EEC on the protection of workers from the risks related to exposure to asbestos at work [Accessed 2021 July 21]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32003L0018>
- EU, (2006). Official Journal of the European Union Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, [Accessed 2021 July 21]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1907-20140410>
- EU, (2009). Official Journal of the European Union. Council Directive 2009/148/EC of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on the protection of workers from the risks related to exposure to asbestos at work [Accessed 2021 July 21]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32009L0148>
- ISO 13794, (1999). Ambient Air—Determination of Asbestos Fibres — Indirect-Transfer Transmission Electron Microscopy Method, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 14966, (2002). Ambient Air—Determination of Numerical Concentration of Inorganic Fibrous Particles—Scanning Electron Microscopy Method, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Marioryad, H., Kakooei, H., Shahtaheri, S. J., Yunesian, M., & Azam, K. (2011). Assessment of airborne asbestos exposure at an asbestos cement sheet and pipe factory in Iran. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 60(2), 200-205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.03.005>
- Melville, R., & Lippmann, M. (2001). Influence of data elements in OSHA air sampling database on occupational exposure levels. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 16(9), 884-899. DOI: <https://doi.org/10.1080/10473220117850>
- Park, S. H. (2018). Types and health hazards of fibrous materials used as asbestos substitutes. *Safety and Health at Work*, 9(3), 360-364. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2018.05.001>
- Rees, D., Phillips, J. I., Garton, E. & Pooley, F.D. (2001). Asbestos lung fibre concentrations in south African chrysotile mine workers. *The Annals of Occupational Hygiene*, 45(6), 473-477, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-4878\(00\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S0003-4878(00)00088-0)
- Rodilla, J. M. R., Cerrada, B. C., Pujadas, C. S., Delclos, G. L., & Benavides, F. G. (2021). Fiber burden and asbestos-related diseases: an umbrella review. *Gaceta Sanitaria*. In Press, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2021.04.001>

- WHO, (2007). World Health Organization, Outline for the development of national programmes for elimination of asbestos-related diseases (No. WHO/SDE/PHE/07.02). World Health Organization.
- ZMKKYHY, (2014). *Regulation on Restriction and Prohibition of Hazardous Substances and Mixtures*, Official Gazette Official Journal number 27277 on 03.07.2009, Ankara. Retrieved from: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/11/20141121-6.htm>



## Mısırdaki Toplam Fenolik ve Antosiyanin İçeriğinin Belirlenmesi için Geliştirilmiş NIRS (Yakın Kızıl Ötesi Spektroskopisi) Kalibrasyon Modelleri Üzerine Kemometrik Yöntemlerin Etkisi

Mehmet Şerment<sup>1</sup>\*, Fatih Kahrıman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup>Tarla Bitkileri Bölümü, Ziraat Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

### Makale Tarihiçesi

Gönderim: 20.02.2021

Kabul: 03.06.2021

Yayın: 20.09.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** –Bu çalışmada öğütülmüş mısır örneklerinde toplam antosiyanin ve fenolik içeriklerinin yakın kızıl ötesi (NIR) spektroskopisi ile tespitine yönelik geliştirilmiş kalibrasyon modellerinde, spektral ön işlem ve dalga boyu seçim yöntemlerinin tahmin başarısına etkisi araştırılmıştır. Araştırma materyali olarak 200 farklı mısır örneği kullanılmıştır. Çalışmada ön işlem olarak; birinci türev (FD), ikinci türev (SD), standart normal değişim (SNV) ve bu yöntemlerin birlikte kullanıldığı 2 farklı kombinasyon karşılaştırılmıştır. Spektral veriler 2 farklı dalga boyu seçim yöntemi (VIP ve SR) ile ayrı ayrı işleme alınmıştır. Ön işlem ve dalga boyu seçim yöntemlerinin uygulanmasından sonra hedef değişkenlerin tahmini için iki farklı model oluşturma tekniğinden (PLS ve SVMR) faydalanılmıştır. Böylelikle, çalışmada toplam fenolik ve toplam antosiyanin içeriği için 36'ar model kıyaslanmıştır. Oluşturulan modeller dış doğrulama işlemine tabi tutularak model güvenilirlikleri test edilmiştir. Çalışma sonucunda mısır tanesinde antosiyanin ve fenolik bileşen içeriğinin tespitinde kullanılan kemometrik yöntem, model başarısını artırdığı görülmüştür. Çalışmada karşılaştırılan modellerden antosiyanin içeriği için FD-SNV-SR kombinasyonu ile oluşturulan modelin (RMSE<sub>Cal</sub>=0.02, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub>=0.96, RPD<sub>Cal</sub>=5.36, RMSE<sub>Val</sub>=0.03, R<sup>2</sup><sub>Val</sub>=0.90, RPD<sub>Val</sub>=3.14) tahmin başarısı yüksek bulunmuştur. Fenolik bileşen içeriği için ise PLS modelleme tekniği daha başarılı (RMSE<sub>Cal</sub>=0.06, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub>=0.66, RPD<sub>Cal</sub>=1.71, RMSE<sub>Val</sub>=0.07, R<sup>2</sup><sub>Val</sub>=0.46, RPD<sub>Val</sub>=1.38) bulunmuştur. Sonuç olarak, uygulanan kemometrik yöntemlerin NIR ile sekonder bileşen tespitine katkı sunduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler** – Dalga boyu seçimi, regresyon, sekonder metabolitler, Zea mays

## The Effect of Chemometric Methods on NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) Calibration Models for Determination of Total Phenolic and Anthocyanin Contents in Maize

### Article History

Received: 20.02.2021

Accepted: 03.06.2021

Published: 20.09.2021

### Research Article

**Abstract** –In this study, the effect of spectral pretreatment and wavelength selection method combinations for determination of total anthocyanin and phenolic contents by near infrared (NIR) spectroscopy on prediction success was investigated. Two hundred maize samples were used as experimental material. As a pre-treatment in the study; First derivative (FD), second derivative (SD), standard normal variate (SNV) were compared with 2 different combinations using these methods together. Spectral data were processed separately with the combination of 2 different wavelength selection methods (VIP and SR). After applying pretreatment and wavelength selection methods, two different model generation techniques (PLS and SVMR) were used to estimate the target variables. Thus, 36 different models each were compared for total anthocyanin and phenolic contents in the study. The model reliability was tested by subjecting the created models to external validation. Results showed that the chemometric method used to determine the anthocyanin and phenolic component content in corn grain increased the model success. Estimation of the model (RMSE<sub>Cal</sub> = 0.02, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub> = 0.96, RPD<sub>Cal</sub> = 5.36, RMSE<sub>Val</sub> = 0.03, R<sup>2</sup><sub>Val</sub> = 0.90, RPD<sub>Val</sub> = 3.14) for anthocyanin content its success was found to be high. For the phenolic content, PLS modeling technique was found to be more successful (RMSE<sub>Cal</sub> = 0.06, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub> = 0.66, RPD<sub>Cal</sub> = 1.71, RMSE<sub>Val</sub> = 0.07, R<sup>2</sup><sub>Val</sub> = 0.46, RPD<sub>Val</sub> = 1.38). As a result, it has been determined that chemometric method applications contribute to secondary component detection with NIR.

**Keywords** – Regression, seconder metabolites, wavelength selection, Zea mays

<sup>1</sup> mehmet\_serment@hotmail.com

<sup>2</sup> fkahrıman@hotmail.com

\*Corresponding Author



## 1. Giriş

Sekonder metabolitler diğer bitki türlerinde olduğu gibi mısırdaki da ürün kalitesini etkileyen önemli bileşenlerdir. Bu bileşenler içerisinde antioksidan etkiye sahip olan fenolik bileşikler ve antosiyaninler hem beslenme hem de sağlık açısından önemlidir. Flavonoid bileşiklerinin en önemli grubunu oluşturan antosiyaninler mısır tanesine renk vermektedir. Renkli mısır genotipleri ise çok uzun yıllardan beridir tatlandırıcı ve renklendirici olarak yetiştirilmekte ve tüketilmektedir (Jing vd., 2005). Fenolik bileşikler ise biyokimyasal olaylarda oksidatif etkileri azaltan ve bitkinin hayatsal faaliyetlerinde rolleri olan biyokimyasallardır. Yulaf, buğday ve prinç ile kıyaslandığında en yüksek antioksidan etki ve fenolik bileşen içeriği mısırdadır (Adom ve Liu, 2002). Mısırın beslenmedeki payı dikkate alındığında bu bileşenlerin artırılması arzu edilmektedir. Bu amaçla son yıllarda antioksidan kapasitesi yüksek mısır genotiplerinin geliştirilmesi için önemli bir çaba harcanmaktadır (Ji vd., 2010). Bu yönde yapılan araştırmalarda ise kullanılan örneklerde antosiyanin ve fenolik bileşenlerin analiz edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Antosiyanin analizlerinde genel olarak özütleme işleminin ardından farklı ölçüm cihazları ve yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin başında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, ince tabaka kâğıt kromatografisi ve son yıllarda güncel hale gelen nükleer manyetik rezonans spektroskopisi gelmektedir (Keleş, 2015). Fenolik bileşenler de antosiyaninlere benzer şekilde özütleme sonrasında kromatografik ya da UV-görünür spektroskopik yöntemler kullanılarak analiz edilebilmektedir. Ancak bu analiz yöntemleri uzun zaman harcayan, yüksek emek ve iş gücü gerektiren, kimyasal sarfının yüksek işlemlere ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle antosiyanin ve fenolik bileşenlerin kısa sürede ve kimyasal harcanmayan çevreci analiz yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu konuda yakın kızıl ötesi spektroskopisi (NIR) önemli alternatiflerden birisidir. Zira NIR spektroskopisi tahıl ürünlerinde farklı biyokimyasal bileşenlerin tespitinde başarılı sonuçlar vermiştir. Bu kapsamda mısır ununda farklı biyokimyasal bileşenlerin tespiti (Baye vd., 2006; Egesel ve Kahrıman, 2012; Egesel vd., 2016; Kahrıman vd., 2019; Kahrıman vd., 2020) için NIR spektroskopisinin kullanıldığı çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. Bu çalışmaların yanı sıra mısırdaki antosiyanin içeriğinin belirlenmesi amacıyla tahmin modellerinin geliştirilmesini konu edinen örnek çalışmalar yapılmıştır (Mangalvedhe vd., 2015). Ayrıca geliştirilen NIR kalibrasyon modellerinin farklı mısır genotipleri karakterize etmek amacıyla bazı araştırmalar yapılmıştır (Redaelli vd., 2016). Özellikle mısır tanesinde diğer biyokimyasal bileşenler üzerine çok sayıda araştırma yürütülmüş olmasına karşın, toplam fenolik ve antosiyanin içeriğinin NIR ile tespitini konu edinen sınırlı sayıda araştırmaya rastlanmıştır (Mangalvedhe vd., 2015; Meng vd., 2015; Redaelli vd., 2016). Bu araştırmaların büyük kısmı modelleme tekniği olarak klasik yaklaşımların kullanılmış olduğu araştırmalardır. Bunların yanı sıra antosiyanin ve fenolik içeriğinin tespitini konu edinen mevcut araştırmalarda kemometrik yöntemlerin çeşitliliğinin ve model başarısına etkisini kapsamlı olarak ele alınmamıştır.

Kemometrik uygulamalar, spektral verilerdeki düzensizliklerin giderilmesi, hedef değişkenle ilişkili dalga boylarının seçilmesi, seçilen dalga boyuna sahip tahmin modellerinin geliştirilmesi ve doğrulanması gibi üç temel adımı içermektedir (Kahrıman ve Egesel, 2018). Spektral verideki istenmeyen değişimlerin ortadan kaldırılması için uygulanan birinci adımda kullanılan tekniklerden bazıları, birinci türev (FD), ikinci türev (SD), Çoklu Saçılma Düzeltmesi (MSC), Standart Normal Değişim (SNV) ve farklı değişken seçim yöntemleri gibi çeşitli geleneksel yöntemlerdir (Yi vd., 2016). FD ve SD gibi türev alma işlemleri üst üste binen spektral piklerin düzeltilmesi ile sinyal düzeltilmesi sağlayan yöntemlerdir (Agelet ve Hurgburg Jr., 2010). MSC ve SNV ise reflektans ölçümlerinde ışık saçılımından kaynaklı bozulmaları gidermek amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (Agelet ve Hurgburg Jr., 2010). Kemometrik uygulamalar içerisinde değişken seçimi amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemler ise; Ardışık Projeksiyonlar Algoritması (SPA), Rekabetçi Uyarlanabilir Yeniden Ağırlıklandırılmış Örnekleme (CARS), Rassal Orman (RF), Değişken Önemlilik Projeksiyonları (VIP), Seçicilik Oranı (SR) yöntemleridir (Lao vd., 2020). Bunlar, spektral veride yer alan değişkenlerin

kalibrasyona konu olan değişkenlerle ilgili olanları veya ilişkisiz olanları belirlemeye imkân vermektedir. Değişken seçim yöntemlerinin kullanılması spektral veride hedef değişken ile en fazla ilişkili olan dalga boylarının modelde kullanılmasına ve daha doğru tahmin sonuçları alınmasına imkân vermektedir. Klasik yöntemler olan kabul edilen modelleme tekniklerinin başlıcaları ise Çoklu Doğrusal Regresyon (MLR) Temel Bileşen Regresyonu (PCR) ve Kısmi En Küçük Kareler Regresyonu (PLSR) yöntemleridir ancak bu yöntemler ışık ile madde arasında doğrusal olmayan ilişkileri yeterince açıklayamamaktadır (Pasquini, 2003). Klasik yöntemlere alternatif olarak geliştirilen ve doğrusal olmayan modelleme teknikleri ise daha çok makine öğrenmesine dayalı yaklaşımlara dayanmaktadır ve ön öğrenmeli ya da ön öğrenmesiz olarak sınıflandırılır. Öğrenme tabanlı olmayan modeller, spektral verilerin genel yapısını anlamak için kullanılırken, öğrenme bazlı modeller önceden bilinen veri yapılarına dayanmaktadır (Yi vd., 2016). Bu yöntemler içerisinde Yapay Sinir Ağları (ANN), Destek Vektör Makineleri (DVM) gibi yöntemler spektral model geliştirme amacıyla yaygın kullanılan tekniklerdendir (Agelet ve Hurgburg Jr., 2010). Spektral model geliştirme adımlarında kemometrik yöntemlerin çeşitli kombinasyonlarının kullanımı, tarımsal ürünlerde biyokimyasal bileşenlerin analizinde NIR cihazlarından yararlanma imkânını artırmaktadır. Bu nedenle NIR tahmin modellerinde hedef değişkene göre uygun kemometrik uygulamaların belirlenmesi önem arz etmektedir.

Bilimsel literatürdeki çalışmalar dikkate alındığında, antosiyanin ve fenolik bileşenler gibi sekonder metabolitlerin NIR ile tespitinde kemometrik yöntemlerin etkisinin yeteri düzeyde araştırılmadığı görülmüştür. Ülkemiz kaynaklı literatürde ise NIR ile toplam antosiyanin ve fenolik içeriğinin belirlenmesini konu edinen herhangi bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bu araştırma öğütülmüş mısırlarda antosiyanin ve fenolik bileşenlerin NIR ile tespitinde farklı ön işlem (Ön işlemsiz, FD, SD, SNV, FD+SNV, SD+SNV), dalga boyu seçim yöntemleri (Tüm spektrum, VIP ve SR) ve modelleme tekniklerinin (PLS ve SVM) etkisini ortaya koymak amacıyla yürütülmüştür. Ayrıca bu çalışmada hedef değişkenler ile spektral veri toplanan bölgedeki dalga boylarının ilişkisi de incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

Çalışmada toplam 200 farklı dane mısır örneği kullanılmıştır. Bu örneklerin tamamı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde 2019 yılında yürütülen mısır ıslah çalışmalarından elde edilmiştir. Kullanılan örnekler tane rengi bakımından farklı özelliklere (beyaz, sarı, turuncu, mor) sahip genotiplere ait olsa da büyük kısmı mısırdaki yaygın görülen tane rengi özelliklerini taşımaktadır. Mısır örnekleri, analize kadar laboratuvarında +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Analiz edilecek örnekler laboratuvar değirmeninde 0.5 mm'lik eleklerle öğütülmüştür.

### 2.2. Ölçümlenen Özellikler

**Toplam Antosiyanin İçeriği (mg/kg):** Örneklerin antosiyanin içerikleri Abdel-Aal ve Hucl (1999) tarafından önerilen yöntemle tespit edilmiştir. Bu amaçla 500 mg öğütülmüş numune 10 ml 1N metanolik HCl (%85:15) içerisinde 30 dk oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Daha sonra örnekler 8000 g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Her bir örneğin üst fazından 200 mikrolitre alınarak 96 kuyucuklu mikroyapıya konulmuş ve 535 nm ve 700 nm absorbans değerleri alınarak cyanidin 3-glucoside eşdeğeri cinsinden (mg/kg CGE) antosiyanin içerikleri belirlenmiştir.

**Toplam Fenolik Bileşen İçeriği (%):** Toplam fenolik bileşen analizlerinde Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırmalar Merkezi (CIMMYT) tarafından geliştirilen metot kullanılmıştır (Galicia vd., 2009). Bu amaçla 20 mg öğütülmüş örnek üzerine 1.3 ml 1.2 M HCl-Metanol çözeltisi eklenerek 42°C'de 1100 rpm'de 30 dk çalkalanmıştır. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 500 mikrolitre üst faz alınarak yeni bir ependorf tüpüne konulmuş ve evaporatörde kurutulmuştur. Kurutulmuş örnek

1.3 m metanol içerisinde çözülerek kolorimetrik reaksiyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla, her bir örnekten 50 mikrolitre alınarak 96 gözenekli mikroplakaya konulmuştur. Örneklerin üzerine 40 mikrolitre %25'lik Folin-Ciocalteu solüsyonu eklenmiş, ardından 110 mikrolitre 400 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilmiştir. Mikroplaka 800 rpm'de 10 saniye çalkalandıktan sonra örnekler 42 °C'de 9 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Ardından örneklerin 765 nm'de absorbans değerleri alınarak gallik asit ile oluşturulan standart küre yardımıyla örneklerin fenolik bileşen içerikleri gallik asit eşdeğeri (%GAE) tespit edilmiştir.

### 2.3. Spektral Modellerin Geliştirilmesi ve Doğrulaması

Öğütülmüş örnekler masaüstü NIRS cihazının (Spectrastar 2400D, Unity Scientific, ABD) döner kap modu kullanılarak, 1200-2400 nm arasında her bir dalga boyuna ait spektral veri alınmıştır. Örneklerden spektral veri toplanırken toplam 48 farklı noktadan ölçüm yapılmış ve bu ölçümlerin ortalaması örnek spektrumu olarak kaydedilmiştir. Örnek spektrumları jdx formatında birleştirilerek kalibrasyon oluşturma çalışmalarında kullanılmak üzere metin (.txt) dosyalarına dönüştürülmüştür. Tahmin modelleri oluşturulmadan önce tüm veri seti kullanarak tip dışı örnekler uzaklaştırılmış ve kalan 200 adet örnek kalibrasyon (n=150) ve dış doğrulama seti (n=50) olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Bu ayırım işleminde Kennard-Stone algoritmasından yararlanılmıştır. Çalışmada 6 farklı ön işlem, 3 farklı seçim yöntemi ve 2 farklı modelleme tekniği kullanılmıştır (Tablo 1). Her ön işleme ait spektral veri her bir dalga boyu seçim yöntemi ile muamele edildikten sonra, her bir modelleme yöntemi ile ayrı ayrı analiz edilmiştir. Böylelikle incelenen her bir özellik için toplam 36 farklı model oluşturulmuş ve değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmada kullanılan ön işlemler spektral modelleme çalışmalarında yaygın kullanılan yöntemlerden seçilmiş olup, bu yöntemlerle ilgili bilgiler giriş bölümünde sunulmuştur.

Tablo 1

Çalışmada kullanılan kemometrik teknikler ve modelleme yöntemleri

Ön İşlem	Dalga Boyu Seçim Yöntemi	Modelleme Tekniği
1) Ön İşlemsiz	1) Tüm Spektral Veri	1) Kısmi En Küçük Kareler Reg. (PLS)
2) Birinci Türev (FD)	2) Değişken Önemlilik Projeksiyon.	2) Destek Vektör Makin. (SVM)
3) İkinci Türev (SD)	3) Seçicilik Oranı (SR)	
4) Standart Normal Değişim (SNV)		
5) FD+SNV		
6) SD+SNV		

Ön işlemler ve modelleme çalışmalarında R programında (R Core Team, 2019) geliştirilen SelectWave web uygulaması (Kahrman ve Liland, 2021) kullanılmıştır. SelectWave uygulaması (<https://bafr.shinyapps.io/SelectWave/>) internet üzerinden farklı kemometrik uygulamalar ile tahmin modeli geliştirmeye imkân veren bir uygulamadır. Bu uygulamaya yüklenen spektral veri ve referans analiz sonuçlarından elde edilen modeller için kalibrasyon setine (n=150) ait RMSE<sub>Cal</sub>, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub> ve RPD<sub>Cal</sub> değerleri ile kalibrasyon seti dışında (n=50) örneklerle yapılan dış doğrulama setinde RMSE<sub>Val</sub>, R<sup>2</sup><sub>Val</sub> ve RPD<sub>Val</sub> istatistikleri hesaplanmıştır. Oluşturulan modeller bu istatistiklere göre değerlendirilmiş olup, RMSE değeri düşük, R<sup>2</sup> ve RPD değerleri yüksek modeller başarılı tahmin veren modeller olarak kabul edilmiştir. RPD değerleri Sans vd. (2020) tarafından önerilen skalaya göre yapılmıştır. Bu skalada modeller iyi (RPD > 2), orta (1.4 < RPD < 2), zayıf (RPD < 1.4) olmak üzere üç sınıfa ayrılmıştır. Değerlendirme yapılırken önce kalibrasyon setine ve dış doğrulama setine ait istatistiklerin her ikisi için de yukarıdaki şartı sağlayan modeller başarılı kabul edilmiştir.

### 3. Bulgular ve Tartışma

#### 3.1. Antosiyanin ve Fenolik İçeriği Bakımından Örnek Setindeki Değişim

Bu çalışmada kalibrasyon ve dış doğrulama setinde bulunan istatistikler Tablo 2’de gösterilmiştir. Antosiyanin içeriği bakımından kalibrasyon setinde bulunan aralık (%0.02 CGE ve %0.47 CGE) değerlerine göre dış doğrulama setindeki örneklerin antosiyanin içeriği setine ait sınırlar içerisindedir. Antosiyaninler mısır tanesinde renk oluşumuna neden olan bileşenlerdir ve genellikle mor-kırmızı renk oluştururlar (Lago vd., 2014). Çalışmamızda kullanılan öğütülmüş mısır örneklerinin beyaz, sarı, turuncu, mor ve kırmızı tane renkli mısırlar bulunmaktadır. Bu durum antosiyanin içeriğine yönelik analiz sonuçlarını ve tanımlayıcı istatistikleri doğrudan etkilemiştir.

Fenolik bileşenler mısır ununda antioksidan etkiye sahip olan biyokimyasallardır. Kalibrasyon seti ve dış doğrulama setinde fenolik asit içeriğinin çok yakın ortalama sahip olduğu buna karşın dış doğrulama setindeki değişimin kalibrasyon setinden daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 2). Lopez-Martinez vd. (2009) mısır ununda ortalama fenolik asit içeriğini 343 mg GAE/100 g (%0.343) olarak rapor etmiştir. Çalışmamızda elde edilen ortalamanın bu değer üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu durum çalışmamızda kullanılan genotip sayısının fazla olmasına ve kullanılan materyalde genetik çeşitlilik bakımından yüksek bir varyasyon bulundurmasına bağlanabilir. Nitekim az sayıda ve genetik çeşitlilik bakımından sınırlı değişim gösteren materyallerle yürütülen bir çalışmada toplam fenol içeriği 112.05- 244.90 µg GAE/g (%0.11-%0.25 GAE) arasında bulunmuştur (Sabancı, 2016).

Tablo 2

Antosiyanin ve fenolik bileşenler için örnek setlerinde tanımlayıcı istatistikler.

Örnek Seti	Antosiyanin (mg CGE/kg)		Fenolik Bileşen (% GAE)	
	Kalibrasyon	Dış Doğrulama	Kalibrasyon	Dış Doğrulama
N	150	50	150	50
Ortalama	0.14	0.12	0.67	0.67
S. Sapma	0.09	0.08	0.09	0.09
Minimum	0.02	0.01	0.41	0.52
Maksimum	0.47	0.37	0.96	0.91

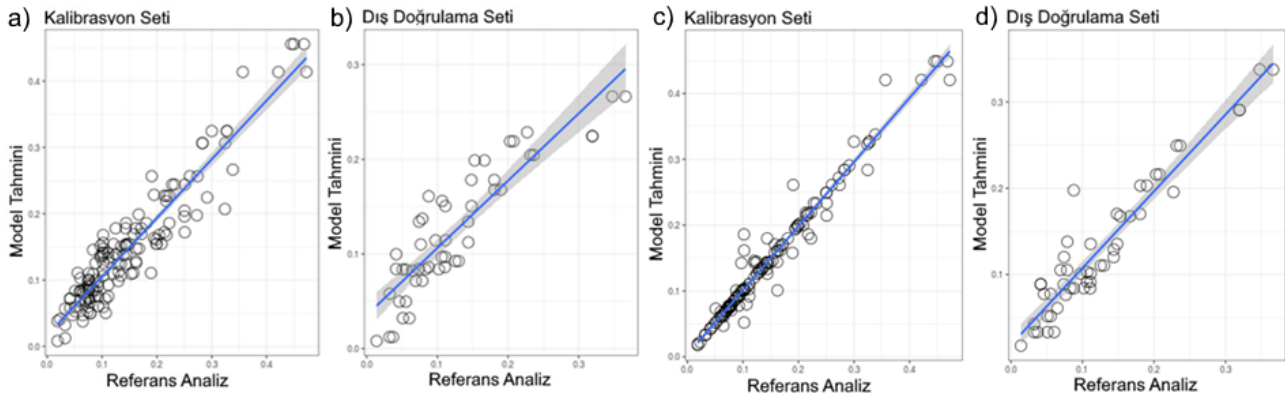
#### 3.2. Kalibrasyon Modellerinin Değerlendirilmesi

Antosiyanin içeriğine yönelik oluşturulan PLS tahmin modelleri için bulunan değerler Tablo 3’de, SVM model değerlendirme sonuçları ise Tablo 4’de gösterilmiştir. PLS yönteminde, FD+SNV ön işleme ve VIP dalga boyu kombinasyonundan (RMSE<sub>Cal</sub>=0.03, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub>=0.87, RPD<sub>Cal</sub> =2.88, RMSE<sub>Val</sub>=0.05, R<sup>2</sup><sub>Val</sub>=0.74, RPD<sub>Val</sub>=1.97) diğer veri seti kombinasyonlarından daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. SVM modelleri içinde FD+SNV+SR kombinasyonu ile oluşturulan modelin diğer modellerden daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Düşük hata ve yüksek R<sup>2</sup> ve RPD değeri veren bu modelin (RMSE<sub>Cal</sub>=0.02, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub>=0.96, RPD<sub>Cal</sub>=5.36, RMSE<sub>Val</sub>=0.03, R<sup>2</sup><sub>Val</sub>=0.90, RPD<sub>Val</sub>=3.14) antosiyanin içeriğinin belirlenmesinde kullanılabileceği saptanmıştır (Tablo 3, Şekil 1). Tüm spektral verinin herhangi bir ön işlem uygulanmadan kullanıldığı PLS modeli (R<sup>2</sup><sub>Cal</sub>=0.15, R<sup>2</sup><sub>Val</sub>=0.10) ile bu modelin R<sup>2</sup> değerleri kıyaslandığında (R<sup>2</sup><sub>Cal</sub>=0.96, R<sup>2</sup><sub>Val</sub>=0.90), spektral veriden yararlanılarak antosiyanin içeriğinin açıklanabilmesi bakımından kalibrasyon setinde yaklaşık 6 kat, dış doğrulama setinde ise 9 kat daha artış olduğunu söylemek mümkündür (Tablo 3). Tüm spektral veriye ön işlem uygulanmasının tahmin başarısını dikkate değer şekilde artırdığı görülse de, dalga boyu seçim yöntemi uygulanması halinde modele ilişkin tahmin gücünün yükseldiği görülmektedir.

Antosiyanin içeriğinin mısır tanesinde NIR spektroskopisi tespitine yönelik bir araştırmada (Mangalvedhe vd., 2015) oluşturulan kalibrasyon modeline ait R<sup>2</sup> değeri 0.72 dış doğrulama setine ilişkin R<sup>2</sup> ise 0.93 olarak



hesaplanmıştır. Araştırmamızda geliştirilen modellerden kalibrasyon seti için benzer sonuçlara ulaşılmış ancak dış doğrulamaya ilişkin  $R^2$  değerleri bu çalışmadan daha düşük bulunmuştur. Bu durumun başlıca nedeni kullanılan örneklerdeki antosiyanin miktarındaki değişimler ve kullanılan spektroskopi cihazlarındaki farklılıklardır. Mangalvedhe vd. (2015) tarafından yürütülen araştırmada 0-900 mg/kg'lık geniş bir varyasyon var iken, kullanılan cihaz ise 900-1650 nm arası taramaktadır. Araştırmamızda ise antosiyanin içeriğine ilişkin varyasyon daha düşük olmakla birlikte kullanılan cihazın tarama aralığı (2100-2400 nm) daha geniştir. Antosiyanin içeriği için spektral veriye ön işlem uygulanması halinde ölçüm başarısının arttığı gözlenmiştir. Kemometrik yöntem uygulamalarının spektral model başarısına olumlu yönde etki ettiğini gösteren farklı çalışmalar vardır (Alfieri vd. 2019; Kahrman, 2017). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar da bu bulguları doğrular niteliktedir.



Şekil 1. Antosiyanin içeriği için PLS yönteminde (a, b) ve SVM yönteminde (c, d) en iyi tahmin sonucu veren kalibrasyon ve dış doğrulama setlerine ait tahmin grafikleri

Tablo 3.

Toplam antosiyanin içeriğine yönelik NIR tahmin modellerine ait değerlendirme istatistikleri

Önişlem	Seçim Yöntemi	RM	RMSE <sub>Cal</sub>	$R^2_{Cal}$	RPD <sub>Cal</sub>	RMSE <sub>Val</sub>	$R^2_{Val}$	RPD <sub>Val</sub>
Ön İşlemsiz	Tüm Spektrum	PLS	0.09	0.15	1.09	0.09	0.10	1.06
FD	Tüm Spektrum	PLS	0.04	0.85	2.66	0.05	0.70	1.85
SD	Tüm Spektrum	PLS	0.04	0.82	2.37	0.06	0.65	1.71
SNV	Tüm Spektrum	PLS	0.03	0.88	2.92	0.05	0.69	1.83
FD+SNV	Tüm Spektrum	PLS	0.06	0.58	1.55	0.07	0.48	1.40
SD+SNV	Tüm Spektrum	PLS	0.04	0.82	2.38	0.06	0.64	1.68
Ön İşlemsiz	VIP	PLS	0.09	0.15	1.09	0.09	0.10	1.06
FD	VIP	PLS	0.04	0.85	2.61	0.05	0.72	1.91
SD	VIP	PLS	0.04	0.82	2.37	0.05	0.68	1.79
SNV	VIP	PLS	0.03	0.87	2.88	0.05	0.74	1.97
FD+SNV	VIP	PLS	0.03	0.86	2.72	0.05	0.71	1.88
SD+SNV	VIP	PLS	0.05	0.75	2.03	0.06	0.62	1.64
Ön İşlemsiz	SR	PLS	0.09	0.15	1.09	0.09	0.10	1.06
FD	SR	PLS	0.04	0.85	2.65	0.05	0.70	1.83

FD: Birinci türev; SD: İkinci türev; SNV: Standart normal değişim; RM: Regresyon metodu; VIP: Değişken önemlilik projeksiyonu; SR: Seçicilik oranı.

Tablo 3 (devamı).

## Toplam antosiyanin içeriğine yönelik NIR tahmin modellerine ait değerlendirme istatistikleri

Önişlem	Seçim Yöntemi	RM	RMSE <sub>Cal</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Cal</sub>	RPD <sub>Cal</sub>	RMSE <sub>Val</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Val</sub>	RPD <sub>Val</sub>
SD	SR	PLS	0.04	0.82	2.37	0.06	0.65	1.71
SNV	SR	PLS	0.07	0.51	1.43	0.07	0.40	1.30
FD+SNV	SR	PLS	0.06	0.57	1.53	0.07	0.47	1.39
SD+SNV	SR	PLS	0.04	0.81	2.36	0.06	0.63	1.66
Ön işlemsiz	Tüm Spektrum	SVM	0.04	0.82	2.39	0.05	0.64	1.69
FD	Tüm Spektrum	SVM	0.02	0.97	5.47	0.03	0.88	2.93
SD	Tüm Spektrum	SVM	0.02	0.96	5.27	0.03	0.88	2.93
SNV	Tüm Spektrum	SVM	0.02	0.96	5.16	0.03	0.88	2.92
FD+SNV	Tüm Spektrum	SVM	0.02	0.97	5.39	0.03	0.88	2.92
SD+SNV	Tüm Spektrum	SVM	0.02	0.96	5.21	0.03	0.88	2.94
Ön İşlemsiz	VIP	SVM	0.10	0.10	0.96	0.08	0.20	1.00
FD	VIP	SVM	0.02	0.97	5.37	0.03	0.89	3.09
SD	VIP	SVM	0.02	0.97	5.50	0.03	0.89	3.11
SNV	VIP	SVM	0.03	0.89	2.99	0.04	0.72	1.92
FD+SNV	VIP	SVM	0.02	0.96	4.85	0.03	0.89	3.09
SD+SNV	VIP	SVM	0.02	0.97	5.46	0.03	0.90	3.13
Ön İşlemsiz	SR	SVM	0.10	0.10	0.96	0.08	0.20	1.00
FD	SR	SVM	0.02	0.97	5.54	0.03	0.89	3.10
SD	SR	SVM	0.02	0.97	5.48	0.03	0.89	3.12
SNV	SR	SVM	0.03	0.90	3.12	0.04	0.80	2.25
FD+SNV	SR	SVM	0.02	0.96	5.36	0.03	0.90	3.14
SD+SNV	SR	SVM	0.02	0.97	5.42	0.03	0.90	3.13

FD: Birinci türev; SD: İkinci türev; SNV: Standart normal değişim; RM: Regresyon metodu; VIP: Değişken önemlilik projeksiyonu; SR: Seçicilik oranı.

Toplam fenolik içeriği için oluşturulan PLS ve SVM model değerlendirme sonuçları ise Tablo 4'de gösterilmiştir. Kullanılan her iki modelleme tekniğinde de ön işlemsiz spektral verinin VIP dalga boyu seçim yöntemine uygulanması ile oluşturulan modellerin, diğerlerinden daha başarılı sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu modellere ait değerlendirme istatistikleri birbiri ile kıyaslandığında ise PLS tekniğinde başarılı bulunan ve ön işlem uygulanmadan VIP dalga boyu seçimi yapılan modelin (RMSE<sub>Cal</sub>=0.05, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub>=0.71, RPD<sub>Cal</sub>=1.87, RMSE<sub>Val</sub>=0.06, R<sup>2</sup><sub>Val</sub>=0.66, RPD<sub>Val</sub>=1.72) SVM tekniğinde başarılı bulunan ve ön işlem uygulanmadan VIP dalga boyu seçimi yapılan modelden (RMSE<sub>Cal</sub>=0.06, R<sup>2</sup><sub>Cal</sub>=0.66, RPD<sub>Cal</sub>=1.71, RMSE<sub>Val</sub>=0.07, R<sup>2</sup><sub>Val</sub>=0.46, RPD<sub>Val</sub>=1.38) nispeten daha başarılı sonuç verdiği izlenmektedir (Tablo 4, Şekil 2). Ancak toplam fenolik içeriği için oluşturulan bu modellerin RPD değerlerine göre modellerin orta düzeyde (1.4 < RPD < 2) güvenilirliğe sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Meng vd. (2015) öğütülmemiş ve öğütülmüş mısır tanesi numunelerinde fenolik bileşen tespitine yönelik geliştirdikleri NIR kalibrasyon modellerinde R<sup>2</sup> değeri %90'ın üzerinde olan modellerin olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada geliştirilmiş modellerin R<sup>2</sup> değerleri Meng vd (2015) tarafından çalışmada geliştirilmiş modellerden düşük bulunmuştur. Bu durumun başlıca nedenlerinden birisi kullanılan örnek setinin fenolik madde içeriği bakımından çok büyük bir değişime sahip olmasıdır. Araştırmamızda bu biyokimyasal

bileşen için tespit edilen sınır değerler nispeten dar bulunmuştur. Bu durum geliştirilen kalibrasyon modellerinin değerlendirme istatistiklerine yansımıştır.

Tablo 4.

Toplam fenolik içeriğine yönelik NIR tahmin modellerine ait değerlendirme istatistikleri

Ön İşlem	Seçim Yöntemi	RM	RMSE <sub>Cal</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Cal</sub>	RPD <sub>Cal</sub>	RMSE <sub>Val</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Val</sub>	RPD <sub>Val</sub>
Ön İşlemsiz	Tüm Spektrum	PLS	0.05	0.71	1.87	0.06	0.65	1.71
FD	Tüm Spektrum	PLS	0.06	0.67	1.75	0.06	0.60	1.60
SD	Tüm Spektrum	PLS	0.05	0.72	1.91	0.07	0.48	1.40
SNV	Tüm Spektrum	PLS	0.06	0.67	1.77	0.06	0.60	1.60
FD+SNV	Tüm Spektrum	PLS	0.06	0.66	1.73	0.06	0.60	1.59
SD+SNV	Tüm Spektrum	PLS	0.06	0.62	1.64	0.07	0.45	1.36
Ön İşlemsiz	VIP	PLS	0.05	0.71	1.87	0.06	0.66	1.72
FD	VIP	PLS	0.06	0.67	1.75	0.06	0.60	1.61
SD	VIP	PLS	0.04	0.83	2.45	0.07	0.55	1.50
SNV	VIP	PLS	0.06	0.68	1.78	0.06	0.61	1.62
FD+SNV	VIP	PLS	0.06	0.66	1.74	0.06	0.60	1.61
SD+SNV	VIP	PLS	0.04	0.80	2.25	0.07	0.53	1.48
Ön İşlemsiz	SR	PLS	0.05	0.71	1.87	0.06	0.65	1.71
FD	SR	PLS	0.06	0.67	1.75	0.06	0.60	1.60
SD	SR	PLS	0.05	0.72	1.91	0.07	0.47	1.39
SNV	SR	PLS	0.06	0.67	1.77	0.06	0.60	1.60
FD+SNV	SR	PLS	0.06	0.66	1.73	0.06	0.60	1.59
SD+SNV	SR	PLS	0.06	0.62	1.64	0.07	0.45	1.36
Ön İşlemsiz	Tüm Spektrum	SVM	0.04	0.83	2.44	0.09	0.34	1.25
FD	Tüm Spektrum	SVM	0.01	0.99	12.21	0.09	0.43	1.34
SD	Tüm Spektrum	SVM	0.01	0.99	10.95	0.09	0.43	1.34
SNV	Tüm Spektrum	SVM	0.01	0.99	11.59	0.09	0.43	1.34
FD+SNV	Tüm Spektrum	SVM	0.01	0.99	13.92	0.09	0.43	1.34
SD+SNV	Tüm Spektrum	SVM	0.01	0.99	12.21	0.09	0.43	1.34
Ön İşlemsiz	VIP	SVM	0.06	0.66	1.71	0.07	0.46	1.38
FD	VIP	SVM	0.02	0.95	4.41	0.08	0.31	1.22
SD	VIP	SVM	0.01	0.99	12.54	0.09	0.22	1.14
SNV	VIP	SVM	0.05	0.79	2.19	0.07	0.45	1.37
FD+SNV	VIP	SVM	0.03	0.88	2.89	0.07	0.43	1.34
SD+SNV	VIP	SVM	0.01	0.99	9.36	0.09	0.22	1.15

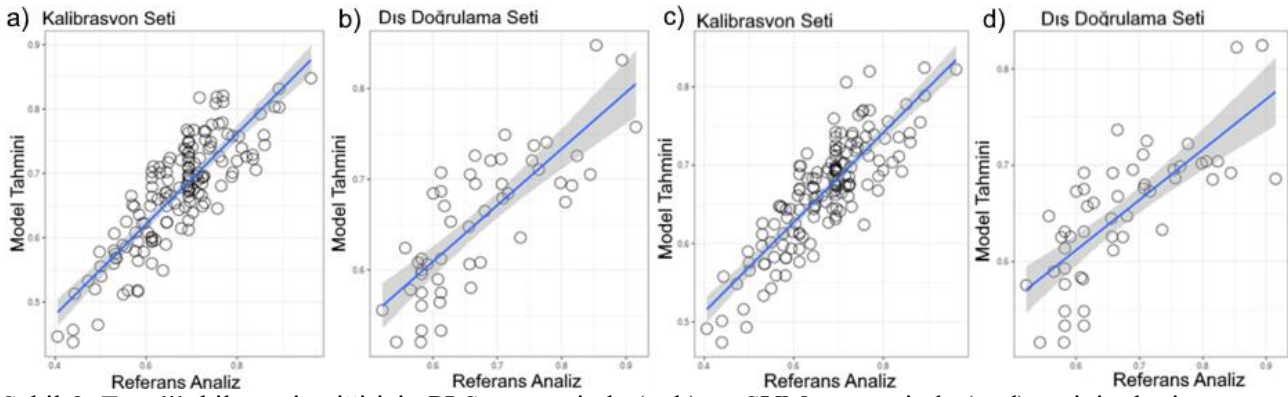
FD: Birinci türev; SD: İkinci türev; SNV: Standart normal değişim; RM: Regresyon metodu; VIP: Değişken önemlilik projeksiyonu; SR: Seçicilik oranı.

Tablo 4 (devamı).

Toplam fenolik içeriğine yönelik NIR tahmin modellerine ait değerlendirme istatistikleri

Ön İşlem	Seçim Yöntemi	RM	RMSE <sub>Cal</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Cal</sub>	RPD <sub>Cal</sub>	RMSE <sub>Val</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Val</sub>	RPD <sub>Val</sub>
Ön İşlemsiz	SR	SVM	0.10	0.20	1.00	0.10	0.10	1.00
FD	SR	SVM	0.01	0.99	8.55	0.08	0.28	1.19
SD	SR	SVM	0.01	0.99	10.99	0.09	0.22	1.15
SNV	SR	SVM	0.04	0.83	2.43	0.07	0.43	1.33
FD+SNV	SR	SVM	0.02	0.98	6.36	0.08	0.33	1.23
SD+SNV	SR	SVM	0.01	0.99	11.84	0.09	0.22	1.14

FD: Birinci türev; SD: İkinci türev; SNV: Standart normal değişim; RM: Regresyon metodu; VIP: Değişken önemlilik projeksiyonu; SR: Seçicilik oranı.



Şekil 2. Fenolik bileşen içeriği için PLS yönteminde (a, b) ve SVM yönteminde (c, d) en iyi tahmin sonucu veren kalibrasyon ve dış doğrulama setlerine ait tahmin grafikleri

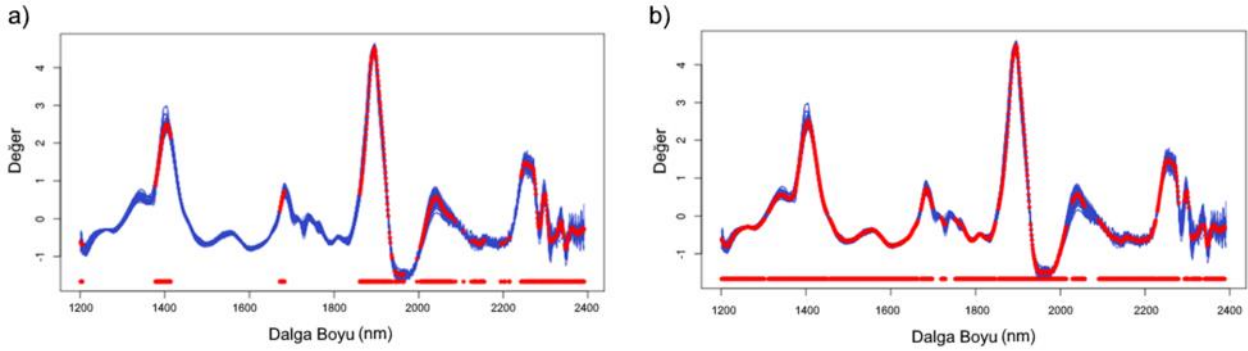
### 3.3. Modellerde Etkili Dalga Boyları

Elektromanyetik spektrumda NIR bölgesindeki dalga boylarının ışık enerjisi ile etkileşimi komplike bir yapıdadır. Maddelerin yapısında bulunan C-H, O-H, N-H ve S-H gibi kimyasal bağların ışık ile etkileşimi sonucunda bu bağlar esneme, bükülme gibi hareketler yapmaktadır (Pasquini, 2003). NIR spektroskopisinde, elektromanyetik spektrumda temel yakın kızıl ötesi bölgesi (750-2500) ile organik bileşenlerin yapısındaki alifatik ve aromatik (C-H), karboksil (C-O), hidroksil (O-H) ve amin-amid (N-H) bağlarının enerji düzeylerindeki değişimin ölçülmesine dayanmaktadır (Williams ve Norris, 1987). Fenolik bileşenler ve antosiyaninler temel olarak C-H, O-H bağları bulunduran biyokimyasal bileşenlerdir. Bu bağ yapıları genel olarak fenolik maddelerle ilişkilendirilmektedir (Nicolai vd., 2007).

Antosiyanin içeriği için oluşturulan PLS ve SVM modellerinde etkili bulunan dalga boylarını gösteren grafik Şekil 3'te gösterilmiştir. Modelleme tekniğine göre etkili bulunan dalga boylarının değişim gösterdiği anlaşılmaktadır. PLS modelinde etkili bulunan dalga boyu sayısı SVM modelinden daha az sayıdadır. PLS modelinde etkili dalga boyları 1200 nm, 1400 nm, 1700 nm ve 1900-2400 nm arasındaki bölgelerde yer almıştır (Şekil 3a). SVM modelinde 1750 nm ve 2050 nm'ye yakın bölgeler dışında kalan bölgelerdeki dalga boylarının tahminleyici olarak yer aldığı görülmektedir (Şekil 3b). Mariani vd. (2015) bitkisel örneklerde antosiyanin içeriğinin NIR spektral bölgesinde yer alan 1232-1279 nm, 1319-1522 nm, 1792-2009 nm ve 2245-2387 nm dalga boylarında oluştuğunu bildirmişlerdir. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı dikkate alındığında hidroksil grubun birinci overton bölgesi 1400-1600 nm arası bölge ile etkileşimde olduğu, C-O ve O-H bağlarının deformasyon bölgesi olan 2100 nm ve O-H, C-C bağlarının kombinasyon bant bölgesi olan 2276 nm'ye yakın bölgeler de antosiyaninlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Noah vd., 1997). Antosiyaninler suda çözünebilir bileşenlerdir bu sebeple örnek içerisindeki nem içeriği ile ilişki olan dalga boylarının da

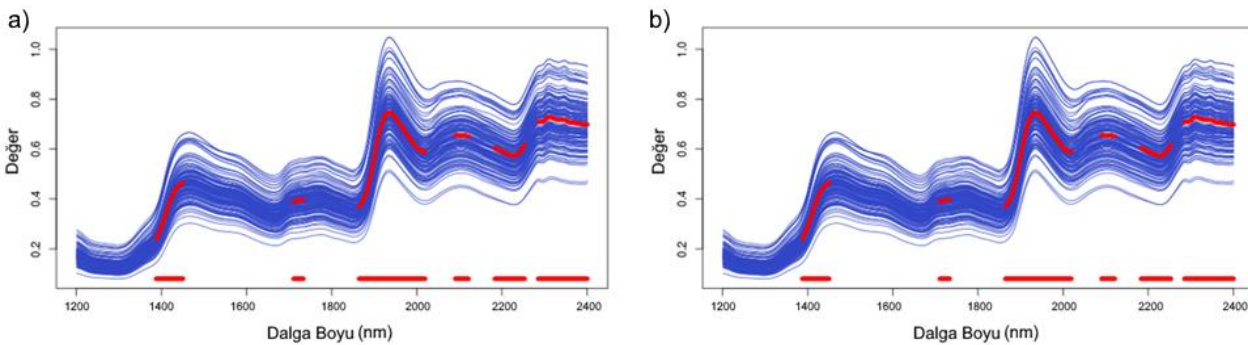


dikkate alınmasında yarar vardır. Su ile NIR bölgesinde ilişkili olduğu bilinen bantlar 760, 970, 1190, 1450 ve 1940 nm dalga boylarıdır (Paulsen ve Singh, 1994). Çalışmamızda tarama yapılan bölgede (1200-2400 nm) su ile ilişkili bulunan dalga boylarının da tahmin modellerinde yer aldığı görülmektedir. Bu durum antosiyanin miktarının söz konusu bantlar tarafından maskelenmesine neden olabilir ve başarılı bulunan modellerde söz konusu bölgelerin elemine edildiği görülmektedir.



Şekil 3. Antosiyanin için en iyi tahmin sonucu veren PLS (a) ve SVM (b) modellerde etkili bulunan dalga boylarını gösteren grafikler

Fenolik bileşenlerin tespitinde PLS ve SVM yöntemlerinde başarılı bulunan modeller için taranan spektral aralıkta (1200-2400 nm) aynı bölgelerin etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 4). Oluşturulan PLS ve SVM yöntemi için 1200 nm, 1500 nm, 1800 nm, 2100 nm ve 2200 nm bölgelerindeki dalga boylarının etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4). Literatürde fenolik bileşenlerin NIR spektral bölgesinde farklı bölgelerle ilgili olduğu rapor edilmiştir. Miller (2001) NIR spektrumunda 1415 nm'den 1512 nm'ye ve 1955 nm'den 2035 nm'ye kadar olan bölgelerin fenolik bileşenlerle ilgili karakteristik bantlar bulunduğunu rapor etmiştir. Diğer fonksiyonel bağ tepkileri içerisinde, O-H hidroksil grubu (1514 nm), C-O bağlarının etkili olduğu 2056 nm ve C-H bağlarının birinci overtone bölgesindeki 1762 nm, 2142 nm ve 2170 nm'deki dalga boylarının fenolik bileşenlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Osborne, 1993). Sorgumda yürütülen bir çalışmada 400-2500 nm arasında taranan spektral aralıkta 508 nm, 608 nm, 114 nm, 1304 nm, 1680 nm, 1904 nm, 2104 nm, 2230 nm ve 2244 nm dalga boylarının tahmin modellerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Alfieri vd., 2019). Çalışmamızda fenolik bileşenlere yönelik modellerde etkili bulunan bölgeler bilimsel çalışmalardaki söz konusu spektral aralıkları içermektedir.



Şekil 4. Fenolik bileşenler için en iyi tahmin sonucu veren PLS (a) ve SVM (b) modellerde etkili bulunan dalga boylarını gösteren grafikler

#### 4. Sonuçlar

Mısır örneklerinde toplam antosiyanin ve fenolik içeriğinin tespitinde NIR spektroskopisi cihazından yararlanılabileceği görülmüştür. Bu cihazda geliştirilen kalibrasyon modellerinde kullanılan kemometrik yöntemlerin model başarısına önemli etkisi olduğu anlaşılmıştır. Araştırmada her özellik için geliştirilen 36 ayrı modelden başarılı bulunan modellerin spektral ön işlem ve dalga boyu seçim yöntemlerinin kullanıldığı modeller olduğu dikkat çekmiştir. Antosiyanin içeriği için FD+SNV+SR kombinasyonu ile SVM modelleme yöntemi oluşturulan modelin tahmin başarısının diğer modellerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Toplam fenolik bileşen için ön işlem uygulanmadan VIP dalga boyu seçim yöntemi diğer kombinasyonlardan daha yüksek başarı sağlasa da, bu modellerin tahmin güvenilirlikleri orta düzeyde kalmıştır. Antosiyanin içeriği için PLS ve SVM modelleme yöntemlerinde farklı dalga boylarının etkili olduğu görülmüş ve SVM yönteminde tarama yapılan spektral aralıkta daha fazla sayıda bölge tahmin modeline dahil olmuştur. Buna karşın toplam fenolik içeriği için ise her iki modelleme yönteminde de etkili dalga boylarının aynı olduğu görülmüştür. İleride bu bileşenlere yönelik çalışmalarda farklı kemometrik yöntemlerin de kullanılması faydalı olacaktır. Kullanılacak örnek setinde hedef değişkenler bakımından varyasyonun örnek sayısı ve biyokimyasal içerik bakımından değişimin artırılması da model başarısını olumlu yönde etkileyebilir. Antosiyanin ve fenolik bileşenlerin yanı sıra diğer sekonder metabolitlerin NIR ile tespitinde kemometrik yöntemlerin etkisine yönelik çalışmalar da yapılmalıdır.

#### Teşekkür

Bu makale Ziraat Yüksek Mühendisi Mehmet Şerment'in yüksek lisans tez çalışmasından derlenmiştir. Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2018-2754.

#### Yazar Katkıları

Mehmet Şerment: Laboratuvar analizlerini yapmış ve makaleyi yazmıştır.

Fatih Kahrıman: Çalışmayı planlamış, istatistik analizleri yapmış ve makale yazımına katkı sunmuştur.

#### Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

#### Kaynaklar

- Abdel-Aal, E.S.M. ve Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76, 350-354. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350>
- Adom, K.K. ve Liu, R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6182-6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>
- Agelet, L.E., Hurburgh Jr., C.R. (2010). A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40:4, 246-260. <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.515468>
- Alfieri, M., Cabassi, G., Habyarimana, E., Quaranta, F., Balconi, C. ve Redaelli, R. (2019). Discrimination and prediction of polyphenolic compounds and total antioxidant capacity in sorghum grains. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 27(1):46-53. <https://doi.org/10.1177/0967033518825351>
- Baye, T.M., Pearson T.C. ve Settles A.M. (2006). Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. *Journal of Cereal Science*, 43(2): 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.11.003>
- Egesel C.Ö. ve Kahrıman F. (2012). Determination of quality parameters in maize by nir reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural Sciences*, 18:43-53. [https://doi.org/10.1501/tarimbil\\_0000001190](https://doi.org/10.1501/tarimbil_0000001190)
- Egesel C.Ö. Kahrıman F. Ekinci N. Kavdir İ. ve Büyükcan M.B. (2016). Analysis of fatty acids in kernel, flour and oil samples of maize by NIR spectroscopy using conventional regression methods. *Cereal Chemistry*, 93:487-492. <https://doi.org/10.1094/cchem-12-15-0247-r>
- Galicia, L., Nurit, E., Rosales, A. ve Palacios-Rojas, N. (2009). Laboratory protocols (2008): *Maize nutrition*

- quality and plant tissue analysis laboratory. CIMMYT, 42. Erişim adresi: <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/804/91513.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ji, H.C., Lee, H.B. ve Takeo, Y. (2010). Major agricultural characteristics and antioxidants analysis of the new developed colored waxy corn hybrids. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 55(1): 55-59. <https://doi.org/10.5109/17800>
- Jing, P. ve Giusti, M. M. (2005). Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corn cobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8775-8781. <https://doi.org/10.1021/jf051247o>
- Kahrıman F., (2017). Mısır yağında yağ asitlerinin uv-vis spektroskopisi ve kemometrik yöntemler yardımıyla tespit edilmesi. *Journal of Food And Health Science*, 3:82-89. <https://doi.org/10.3153/jfhs17011>
- Kahrıman, F., Öner, F., Türk, F., Gökçe, A., Düzen, E., Onaç, İ. ve Egesel C.Ö. (2017). Efficiency of different chemometric methods for determination of oil content in maize by nir spectroscopy, *AGROSYM (2017)*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 5-8 October 2017. Erişim adresi: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/FullTextPDF/2018/20183050244.pdf>
- Kahrıman, F. ve Egesel C.Ö. (2018). Using near infrared (NIR) spectroscopy in the analysis of cereal products: the example of maize, In: *Recent researches in science and landscape management*, Ed: Prof. Dr. Recep Efe, (pp. 560-574).
- Kahrıman, F., Onaç, İ., Mert F., Öner F. ve Egesel, C.Ö., (2019). Determination of carotenoid and tocopherol content in maize flour and oil samples using near-infrared spectroscopy. *Spectroscopy Letters*, 52, 473-481. <https://doi.org/10.1080/00387010.2019.1671872>
- Kahrıman, F., Onaç, İ., Öner, F., Mert-Türk, F. ve Egesel C.Ö. (2020). Analysis of secondary biochemical components in maize flour samples by NIR (near infrared reflectance) spectroscopy. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14:2320–2332. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00479-0>
- Kahrıman, F. ve Liland, K-H. (2021). SelectWave: a graphical user interface for spectral data analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 212:104275. [https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104275\\_](https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104275_)
- Keleş, Y. (2015). Antosiyanin pigmentlerin biyokimyası ve analizi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (1): 19-25.
- Lago, C., Cassani, E., Zanzi, C., ve Pulu R. (2014). Development and study of a maize cultivar rich in anthocyanins: coloured polenta, a new functional food. *Plant Breeding*, 133(2):210–217. <https://doi.org/10.1111/pbr.12153>
- Lao, C., Zhang, Z., Chen, J., Chen, H., Yao, Z., Xing, Z., Tai, X., Ning, J., Chen, Y. (2020). Determination of in-situ salinized soil moisture content from visible-near infrared (VIS–NIR) spectroscopy by fractional order derivative and spectral variable selection algorithms. *International Journal of Precision Agricultural Aviation*, 3(3):21-34. <https://doi.org/10.33440/j.ijpaa.20200303.98>
- Lopez-Martinez, L.X., Oliart-Ros, R.M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C.H., Parkin, K.L. ve Garcia, H.S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*, 42:1187–92. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.010>
- Mangalvedhe, A.A., Danao, M.C., Paulsmeyer, M., Rausch, K.D., Singh, V. ve Juvik, J.A. (2015). Anthocyanin determination in different corn hybrids using near infrared spectroscopy. *ASABE Annual International Meeting*, New Orleans. Paper Number: 152181716.
- Mariani, N.C.T., Teixeira, G.H.A., Lima, K.M.G., Morgenstern, T.B., Nardini, V. ve Cunha, L.C. (2015). NIRS and iSPA-PLS for predicting total anthocyanin content in jaboticaba fruit. *Journal of Food Chemistry*, 174: 643–648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.008>
- Meng, Q., Murray, S.C., Mahan, A., Collison, A., Yang, L. ve Awika, J. (2015). Rapid estimation of phenolic content in colored maize by near-infrared reflectance spectroscopy and its use in breeding. *Crop Science*, 55: 2234-2243. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.11.0767>
- Miller C.E. (2001). Chemical principles of near-infrared technology. In: Williams P.C., Norris K.H., editors. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2nd ed. American Association of Cereal Chemists; St. Paul, MN, USA.
- Nicolaï, B.M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I. ve Lammertyn, J. (2007).

- Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 46:99–118. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024>
- Noah, L., Robert, P., Millar, S. ve Champ, M. (1997). Near-infrared spectroscopy as applied to starch analysis of digestive contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2593–2597. <https://doi.org/10.1021/jf960891n>
- Osborne B.G., Fearn T. ve Hindle P. (1993). *Practical nir spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Longman Scientific and Technical; London, UK: 1993.
- Pasquini, C., (2003). Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2):198-219. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532003000200006>
- Paulsen, M. R., Mbuvi, S. W., Haken, A. E., Ye, B. ve Stewart, R. K. (2003). Extractable starch as a quality measurement of dried corn. *Applied Engineering in Agriculture* 19: 211–217. <https://doi.org/10.13031/2013.13097>
- R Core Team, (2019) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>
- Redaelli R., Alfieri M. ve Cabassi G. (2016). Development of a NIRS calibration for total antioxidant capacity in maize germplasm. *Talanta*, 154:164-168. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.048>
- Sabancı, S. (2016). Ege bölgesinde yetiştirilen bazı mısır (*Zea mays* L.) çeşitlerinin verim, kalite ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın
- Sans, S., Ferré, J., Boqué, R., Sabaté, J., Casals, J., Simó, J. (2020). Estimating sensory properties with near-infrared spectroscopy: a tool for quality control and breeding of ‘Calçots’ (*Allium cepa* L.). *Agronomy*, 10:828. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060828>
- Williams, P. ve Norris, K.H. (1987). *Near-infrared technology in the agricultural and food Industries*. 2nd Edn., American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN., ISBN-13: 9780913250495, p 330.
- Yi, L., Dong, N., Yun, Y., Deng, B., Ren, D., Liu, S. ve Liang, Y. (2016). Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica Chimica Acta*, 914:17-34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.001>





## Hipoksi ve Kanser

Sümeyye Aydoğan Türkoğlu<sup>1\*</sup>, Fatma Poyrazlı<sup>2</sup>, Derya Okuyan<sup>3</sup>, Feray Köçkar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye

<sup>2</sup>Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye

<sup>3</sup>Laborant ve Veteriner Sağlık Pr., Susurluk Meslek Yüksekokulu, Bandırma Onyedi Eylül Üniversitesi, Bandırma, Türkiye

### Makale Tarihiçesi

Gönderim: 02.05.2021

Kabul: 18.08.2021

Yayın: 20.09.2021

### Derleme Makale

**Öz** – Dokudaki gerekli oksijen seviyesinin normal değerinin altına düşmesi hipoksi olarak tanımlanır. Hipoksi katı tümörlerde sık karşılaşılan bir durumdur. Tümör hücreleri yeterli oksijen alamadığında hücre ölümüne gitmeden önce genetik farklılıklar oluşturarak hipoksik duruma adapte olmaktadır. Bazı tümörlerde radyo veya kemoterapötik tedavi direncinin gelişiminde hipoksinin rol oynadığı gösterilmiştir. Birçok klinik çalışma sonucunda tümörün hipoksik olduğu ve hipoksik durumun yükselmesiyle de tümör çapının arttığı gösterilmiştir. Hipoksik hale gelen tümör hücrelerinin, hücre ölüm sinyallerine ve apoptoza karşı duyarlılığının azalması sonucu bölgesel ve sistemik olarak agresif olabilmektedir. Ayrıca hipoksi; tümör proliferasyonu, anjiyogenez ve sistemik metastaz sinyalizasyonunu arttırabilmektedir. Hücrelerdeki hipoksinin moleküler mekanizmasından sorumlu temel protein ailesi HIF (Hipoksi ile İndükelenebilir Faktör) dir. Bugüne kadar, insan hücrelerinde düşük oksijen seviyelerine yanıt olarak üç HIF protein ailesi üyesi tespit edilmiştir. HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 olarak isimlendirilen bu heterodimerlerin her birisi, normoksik koşullarda ayrışan  $\alpha$  alt birim ve  $\beta$  alt birimden oluşan proteinlerdir. HIF ailesi üyeleri glikoz alımı ve metabolizması, eritropoez, anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve apoptoz dahil üzere birçok hücrenel süreçte yer alan genlerin ifadesini düzenleyerek hem oksijen dağıtımını hem de oksijen yoksunluğuna adaptasyonu kolaylaştırır. Bu derleme, HIF' in moleküler çalışma mekanizmasını, hipoksinin biyolojik fonksiyonlarını ve hücre kültürü laboratuvarlarında kullanılan farklı hipoksi modellerini özetlemektedir.

**Anahtar Kelimeler** – Deneysel hipoksi, HIF, Hipoksi, Kanser, Kimyasal hipoksi

## Hypoxia and Cancer

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, University of Balıkesir, Balıkesir, Turkey

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Balıkesir, Balıkesir, Turkey

<sup>3</sup>Veterinary Sciences Pr., Susurluk Vocational School, Onyedi Eylül University, Bandırma, Turkey

### Article History

Received: 02.05.2021

Accepted: 18.08.2021

Published: 20.09.2021

### Review Article

**Abstract** – A decrease in the required oxygen level in the tissue below the normal value is defined as hypoxia. Hypoxia is a common condition in solid tumors. When tumor cells can not get enough oxygen, they adapt to the hypoxic state by creating genetic differences before going to cell death. Hypoxia has been shown to play a role in developing radio or chemotherapeutic treatment resistance in some tumors. As a result of many clinical studies, it has been demonstrated that the tumor is hypoxic, and the diameter of the tumor increases with a hypoxic state. As a result of the decreased sensitivity of tumor cells to cell death signals and apoptosis, tumor cells can become regionally and systemically aggressive. Also, hypoxia can increase tumor proliferation, angiogenesis, and systemic metastasis signaling. The main protein family responsible for the molecular mechanism of hypoxia in cells is HIF (Hypoxia Inducible Factor). To date, three HIF family members have been identified in response to low oxygen levels in human cells. Named as HIF-1, HIF-2 and HIF-3, each of these heterodimers consists of  $\alpha$  subunit and  $\beta$  subunit decomposing under normoxic conditions. Members of the HIF family facilitate both oxygen delivery and adaptation to oxygen deprivation by regulating the expression of genes involved in many cellular processes, including glucose uptake and metabolism, erythropoiesis, angiogenesis, cell proliferation, and apoptosis. This review summarizes the molecular working mechanism of HIF, the biological functions of hypoxia, and different hypoxia models used in cell culture laboratories.

**Keywords** – Cancer, Chemical hypoxia, Experimental hypoxia, HIF, Hypoxia

<sup>1</sup> saydogan@balikesir.edu.tr

<sup>2</sup> fpoyrazli@baun.edu.tr

<sup>3</sup> dokuyan@bandirma.edu.tr

<sup>4</sup> fkoçkar@balikesir.edu.tr

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Oksijen, aerobik hücrelerin enerji metabolizmasında önemli bir faktördür. Çoğu anabolik süreç, sinyal yolları ve enzimatik reaksiyonlar, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ve glikolizden üretilen ATP' ye ihtiyaç duyar. Hücreler, hücrel oksijen tedarikini sınırlayan farklı koşullara maruz kaldıklarında, oksidatif metabolizma tehlikeye girer ve ATP' ye bağlı süreçleri etkiler (Mungai, Waypa, Jairaman, Prakriya, Dokic vd., 2011; Wang, Jang, Rue ve Semenza 1995). Dokudaki gerekli oksijen seviyesinin normal değerinin altına düşmesi hipoksi olarak adlandırılır (Selvendiran, Bratasz, Kuppusamy, Tazi, Rivera vd., 2009).

Hipoksi katı tümörlerde sık karşılaşılan bir durumdur. Tümör hücreleri yeterli oksijen alamadığında hücre ölümüne gitmeden önce genetik farklılıklar oluşturarak hipoksik duruma adapte olmaktadır (Çekin, 2007). Bazı tümörlerde radyo veya kemoterapötik tedavi direncinin gelişiminde hipoksinin rol oynadığı gösterilmiştir. Birçok klinik çalışma sonucunda tümörün hipoksik olduğu ve hipoksinin yükselmesiyle de tümör çapının arttığı gösterilmiştir. Apoptoz programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır ve zararlı olan hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Bu mekanizma birçok dokunun düzgün gelişiminde rol oynamaktadır ayrıca yetişkinlerde organ fonksiyonlarının gelişimi için kritik bir göreve sahiptir. Apoptoz çoğunlukla birçok hücre içi ve hücre dışı sinyal molekülleri vasıtasıyla ya da fizyolojik ve patolojik indükleyiciler aracılığıyla başlayabilmektedir. Hücreler yoğun hipoksi altında ya da anoksi (oksijen eksikliği) sırasında mutasyona uğramış ve hipoksi ile indüklenmiş hücrelerin birikmesini önlemek için apoptoza giderler (Guo, Song, Jiang, Liu, Yu vd., 2006). Ancak, hipoksik hale gelen tümör hücrelerinin, hücre ölüm sinyallerine ve apoptoza karşı duyarlılığının azalması sonucu bölgesel ve sistemik olarak agresif olabilmektedir. Ayrıca hipoksi tümör hücrelerinin proliferasyon, anjiyogenez ve sistemik metastaz sinyalizasyonunu arttırabilmektedir (Selvendiran vd., 2009).

Hücrelerdeki hipoksinin moleküler mekanizmasından sorumlu temel protein HIF' dir. 1992 yılında (Eritropoietin) EPO' nun 3' Hipoksi cevap elementi (HRE; 5-RCGTG-3) ile oksijene bağımlı bir şekilde etkileşen çekirdek faktörü keşfedilmiştir. Bu DNA bağlayan komplekse "Hipoksi ile indüklenbilir faktör-1" ya da 'HIF-1' olarak isimlendirilmiştir. (Goldberg, Monyer ve Choi, 1988; Semenza, Nejfelt, Chi ve Antonarakis, 1991; Tepebaşı ve Calaboğlu, 2016). Hipoksideki moleküler mekanizmanın genetik cevabı için bir büyüme faktörünü kodlayan EPO geni için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. EPO, kırmızı kan hücrelerin üretimini düzenleyerek, fizyolojik oksijen homeostazının temel belirleyicilerinden biri olan kan oksijen taşıma kapasitesini kontrol eden hematopoietik bir büyüme faktörüdür. Rekombinant EPO, belirli anemi tiplerinin, özellikle kronik böbrek hastalığıyla bağlantılı aneminin tedavisinin temel dayanağı olarak kullanılmıştır. Böbrek ve karaciğer hücreleri tarafından EPO mRNA' sı ve protein üretimi seviyeleri 1.000 kat veya daha fazla artabilir. Bu yanıt, oksijenle düzenlenmiş gen ekspresyonu çalışmaları için ilk odak noktasıydı ve HIF, bu sürecin merkezi transkripsiyon aracısı olarak tanımlanarak keşfedilmiştir. Transkripsiyon faktörü olan HIF-1 $\alpha$ ' nın DNA üzerindeki HRE bölgesine bağlandığı ve bu şekilde hipoksiye cevap vererek gen ekspresyonunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Baysal, 2016; Çekin 2007; Wang vd., 1995; Rankin ve Giaccia, 2008; Selvendiran vd., 2009).

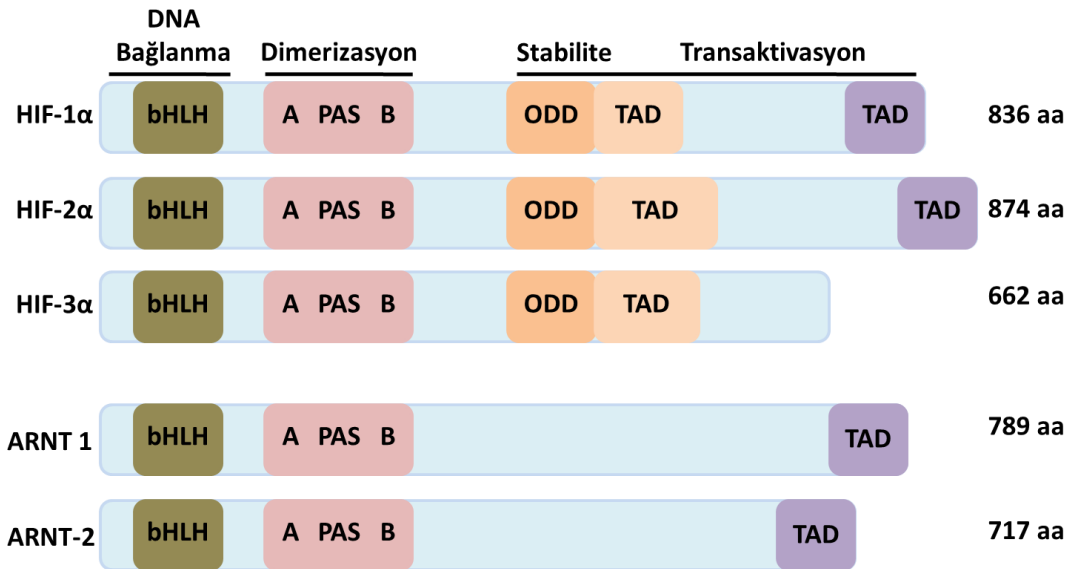
## 2. HIF Ailesi ve Protein Yapısı

HIF ailesi üyeleri glikoz alımı ve metabolizması, eritropoez, anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve apoptoz dahil olmak üzere birçok hücrel süreçte yer alan genlerin ifadesini düzenleyerek hem oksijen dağıtımını hem de oksijen yoksunluğuna adaptasyonu kolaylaştırırlar. Bunlar, oksijene duyarlı ve heterodimerler olarak DNA' ya bağlanan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu proteinleri temel sarmal-döngü-sarmal (basic helix loop helix; bHLH) transkripsiyon faktörlerinin PAS (PER-ARNT (arilhidrokarbon reseptörü nükleer translokator) -SIM) ailesinin üyeleridir. ARNT olarak da bilinirler ve HIF-1' in  $\beta$  alt birimini ifade ederler (Goldberg vd., 1988; Rankin vd., 2008).

Bugüne kadar, insan hücrelerinde düşük oksijen seviyelerine yanıt olarak üç HIF ailesi üyesi tespit edilmiştir. HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 olarak isimlendirilen bu heterodimerlerin her birisi, normoksik koşullarda ayrışan  $\alpha$  alt

birim ve  $\beta$  alt birimden oluşur (Javan ve Shahbazi, 2017; Rankin vd., 2008; Tameemi, Dale, Jumailyand ve Forsyth, 2019). Hipoksik durum hücrel ve gelişimsel yanıtlara esas olarak HIF1A geni tarafından kodlanan HIF-1 $\alpha$  aracılık eder. Alternatif birleştirme ile üretilen üç HIF-1 $\alpha$  izoformu (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ) tanımlanmıştır (Yeo, 2019). Tüm HIF ailesi üyelerinde bulunan bHLH domaini, DNA bağlanmasına ve PAS domain ise dimerizasyonuna aracılık eder. Bu proteinin aktif bölgesi, bir oksijen sensörü olarak işlev gören oksijen bağımlı degradasyon domaini (ODD) içerir. Şekil 1, HIF ailesi üyelerinin domain yapısını göstermektedir. Ek olarak, HIF ailesi üyeleri, hedef gen aktivasyonuna aracılık eden transaktivasyon domaini (TAD) içerir. HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ , hedef gen aktivasyonuna katkıda bulunan iki TAD bölgesi içerir (Rankin vd., 2008; Torres, Navaa, Ruiz, Quiroz ve Gutierrez, 2017). HIF-1 $\alpha$  alt birimi, bir inhibitör alan ile köprülenmiş TAD-N ve TAD-C (sırasıyla N ve C terminal transaktivasyon alanları) içerir. TAD-N, ODD ile örtüşür ve protein stabilitesi ile ilişkilidir. TAD-C, protein stabilitesinden bağımsız olarak p300/ CBP gibi ortak aktifleştirici ile etkileşime girer ve tam HIF aktivitesi için gereklidir (Lando, Peet, Gorman, Whelan, Whitelaw vd., 2002). Yapılan çalışmalarla, HIF-1' in insan ve fare dokularında her yerde eksprese edildiğini ve oksijen eksikliğinde eritropoez ve glikoliz gibi fizyolojik reaksiyonların sekteye uğramaması için anjiyogenezde de regülatör role sahip olduğu belirlenmiştir (Semenza, 1988).

Üç izoform arasında izoform 1, hem yapısal hem de işlevsel olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve karakterize edilmiştir (Selvendiran vd., 2009). HIF-1 $\alpha$ , kromozom 14q21-24 içinde yer alan HIF1A geni tarafından kodlanan ve 15 ekzondan oluşan bir transkripsiyon faktördür. HIF-1 $\alpha$ , 836 amino asitten oluşur ve moleküler ağırlığı 120 kDa' dır. HIF-1 $\alpha$ , her ikisi de çift sarmal şeklinde düzenlenmiş iki zincirli, alfa zinciri (oksijen tarafından düzenlenir) ve beta zincirinden oluşan bir heterodimerdir. İki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) vardır, ancak sadece C-terminal konumunda bulunan NLS, çekirdekte HIF-1 $\alpha$  birikiminden sorumludur. N-terminal bölgesinde, HRE aracılığıyla dimerizasyon ve DNA bağlanması için gerekli olan bHLH ve PER-ARNT-SIM A (PAS A) alanları bulunur (Çekin, 2007).



Şekil 1. HIF ailesi üyelerinin domain yapısı (Rankin vd., 2008' den esinlenerek çizilmiştir.)

HIF' ler oksijen yoksunluğunda transkripsiyonel tepkilere aracılık eden transkripsiyon faktörlerinin (bHLH)/PER-ARNT-SIM (PAS) etki alanı ailesinin üyeleridir. Oksijene duyarlı bir HIF- $\alpha$  alt biriminden (HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$  veya -3 $\alpha$ ) ve bir yapısal HIF- $\beta$  alt biriminden (ARNT1 ve ARNT2) oluşan heterodimerler olarak DNA' ya bağlanırlar. Tüm HIF ailesi üyelerinde bulunan bHLH ve PAS alanları, sırasıyla DNA bağlanmasına aracılık eder. HIF- $\alpha$  alt birimi özel bir ODD içerir. Ek olarak, HIF ailesi üyeleri, hedef gen aktivasyonuna aracılık eden TAD alanları içerir. HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ , hedef gen aktivasyonuna katkıda bulunan iki TAD

bölgesi bulundurur. HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ 'nın DNA bağlanma ve dimerizasyon domainleri yapısal bir perspektiften benzer olsa da, bu iki formun transaktivasyon domainleri birbirinden farklıdır (Şekil 1). HIF-2 aynı zamanda endotelial PAS proteini, HIF benzeri faktör (HLF), HIF ile ilişkili faktör (HRF) ve 'Per-Arnt-Sim' (PAS) süper ailesi 2' nin (MOP2) üyesi olarak da adlandırılır. HIF-1 ile yaklaşık %48 amino asit sekans homolojisine sahiptir. Başka bir fark ise HIF-1 $\alpha$ 'nın her yerde yaygın bir ifadeye sahip olması, HIF-2 $\alpha$  ifadesinin ise spesifik dokularla daha sınırlı olmasıdır. HIF-1 $\alpha$ 'nın aksine HIF-2 $\alpha$  ekspresyonu, endotel hücreleri, glial hücreler, tip II pnömositler, kardiyomyositler, böbrek fibroblastları, pankreas ve duodenum interstisyel hücreleri ve hepatositleri içeren spesifik hücre tipleriyle sınırlıdır. Genel olarak, iki form hipoksiye farklı biyolojik cevaplar vermektedir (Rankin vd., 2008; Tameemi vd., 2019).

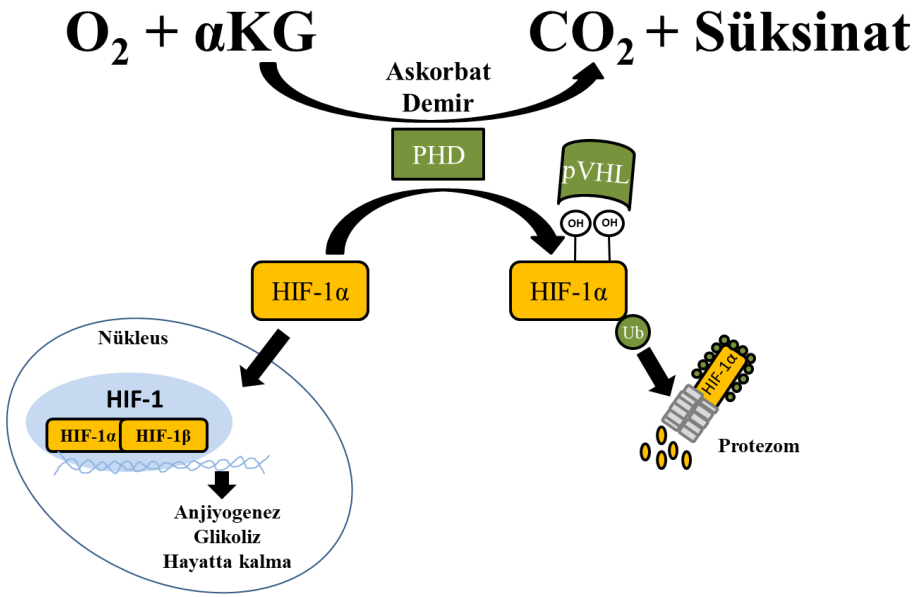
HIF-3 $\alpha$ , sırasıyla HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ 'ya %57 ve 53 amino asit sekans özdeşliği olan bir bHLH-PAS alanını ve sekans olarak %61 benzer ODD alanını şifreler. Transaktivasyon alanı HIF-3 $\alpha$ 'da mevcut değildir, bu da bu formun baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu anlamına gelir ve HIF-1 $\alpha$ 'nın kendisine bağlanarak transkripsiyonu başlatmasını önler. Bu eylem nedeniyle HIF-3 $\alpha$ , 'inhibitör Per-Arnt-Sim PAS' alanı (IPAS-PAS) olarak da adlandırılır (Rankin vd., 2008; Tameemi vd., 2019). IPAS/HIF-1 $\alpha$  kompleksi HRE bölgesine bağlanamaz. Bu nedenle, IPAS, HIF aracılı hedef gen ekspresyonunu ve HIF-1 $\alpha$ 'nın transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe eder. (Lee, Bae, Jeong, Kim ve Kim, 2004). En geç keşfedilen HIF-3, çeşitli dokularda ekspre edilmektedir. İlk olarak IPAS'ın birleşmesi ile HIF-3, keşfedilmiştir (Lee vd., 2004) ve HIF-1 ile dimerize olarak HRE'lere bağlanır (Gu, Moran, Hogenesch, Wartman ve Bradfield 1998). IPAS hiçbir endojen transaktivasyon aktivitesine sahip değildir. HIF-1' in amino terminal bölgesi ile etkileşime girerek, HIF-1' in dominant negatif regülatörü olarak hareket edip DNA'ya bağlanmasını önler (Makino, Cao, Svensson, Bertilsson, Asman vd., 2001). HIF regülasyonunda antagonistik etki gösterdiği düşünülen HIF-3 $\alpha$ , inhibitör görevi gösteren PAS domain proteini (IPAS) üzerinden HIF-1 $\alpha$ 'yı negatif regüle ederek HIF sistemini inhibe eder (Illingworth, Loe-narz, Schofield ve Domene, 2010).

Oksijen seviyeleri, HIF- $\alpha$  alt birimlerinin protein stabilitesini, hücre içi lokalizasyonunu ve transkripsiyonel potansiyelini etkileyebilirken, ARNT alt birimi yapısal olarak çekirdekte eksprese edilir ve aktivitesi hipokside etkilenmez. HIF-1 $\alpha$ , bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynamak için ARNT ile dimerleşir. Her alt birim, PAS-A ve PAS-B olarak adlandırılan iki PAS alanını içerir. bHLH ve PAS alanları,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimi arasında heterodimer oluşumu ve DNA bağlanması için gereklidir (Lee vd., 2004).

### 3. Oksijen Bağımlı HIF Yolu

Hipoksi, hücrelerin veya dokuların yeterli oksijenden yoksun kalmasına neden olan, oksijen dağıtımı ve oksijen tüketimi arasındaki homeostatik dengenin düzensizliğidir (Martin, Diamond, Gronthos, Peet ve Zannettino, 2011). HIF-1, düşük oksijen ortamına hücre adaptasyonunun ana düzenleyicisidir (Dengler ve Espinosa, 2013). Normoksi durumunda, HIF-1 $\alpha$ 'daki ODD domaini içindeki iki prolin rezidüsü üzerinde bulunan prolin hidroksilazlar PHD'ler vonHippel-Lindau (pVHL-tümör baskılayıcı protein) ubiquitinasyonu ve proteazomal bozunmayı tetikler. Hidroksilasyon reaksiyonu,  $\alpha$ KG (PHD substrat alfa-ketoglutarat)'nin süksinata dönüşümüyle gerçekleştirilir ve bunun için askorbat ve demir (PHD ko-faktörler) ko-faktör olarak kullanılır. Buna paralel olarak, oksijene bağımlı bir şekilde PHD'lere benzer düzenlenen bir asparajinil hidroksilaz olan HIF' i önleyen faktör (FIH), ko-aktivatör alımını önleyerek normoksideki HIF-1 transkripsiyonel aktiviteyi bastırır. Hipoksi ise, PHD'leri inhibe eder ve HIF-1 $\alpha$ 'yı stabilize eder. Daha sonra çekirdeğe geçer ve yapısal olarak ifade edilen HIF-1 $\beta$  ile dimerize olur. Şekil 2, HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijene bağımlı düzenlenmesini göstermektedir. Aktif HIF-1 kompleksi oluşturur ve glikolitik metabolizmayı, anjiyogenez ve hayatta kalmayı teşvik eden genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Lommarini, Porcelli, Gasparre ve Kurelac, 2017; Maxwell, Wiesener, Chang, Clifford, Vaux vd., 1999).





Şekil 2. HIF-1α' nın oksijene bağımlı düzenlenmesi (Lommarini vd., 2017' den esinlenerek çizilmiştir.)

Normoksi durumunda, iki prolin kalıntısı üzerinde, PHD' ler HIF-1α, pVHL aracılı ubiquitinasyonu ve hidroksilasyon reaksiyonu, αKG' nin süksinata dönüşümüyle birleştirilir ve bu durum için askorbat ile demir içeren ko-faktör gerekir. Hipoksida, hidroksilasyon inhibe edilir ve HIF-1α ile HIF-1β dimerize olarak ilgili transkripsiyon faktörlerine bağlanırlar ve anjiyogenez, glikolitik metabolizma ve hayatta kalmayı destekleyen genleri uyarırlar.

HIF-1α ve HIF-2α yüksek derecede sekans özdeşliği, benzer bir protein yapısı ve birkaç ortak hedefi paylaşmasına rağmen, benzersiz gen regülasyon modellerine aracılık ederler. HIF-1α her yerde eksprese edilirken, HIF-2α yalnızca belirli hücre türleri ve tümör türleri tarafından ifade edilir. HIF-1α, akut hipoksiye yanıtta baskın bir rol oynar, HIF-2α ise kronik hipoksiye yanıtı yönlendirir (Yu, Tang ve Sun 2017).

#### 4. Hipoksi ve Anjiyogenez

Anjiyogenez oldukça karmaşık bir süreç ile gerçekleşir. Vasküler sistem, vaskülogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki farklı sistem üzerinden gelişir. Yeni kan damar oluşumuna yetişkinlerde anjiyogenez adı verilirken, embriyonik gelişim safhasındaki kan damarı farklılaşmasına ise vaskülogenez adı verilir. Anjiyogenez sisteminde damardaki endotelial hücrelerin etrafını saran bazal membran, enzimatik reaksiyonlarla degrade olur ve anjiyogenik uyarınları takiben endotelial hücreler komşu stromaya geçer. Ardından hücrelerin farklılaşması, maturasyonu ile başlayan süreçte lümen oluşumunu takiben perisitlerin göçü ve tüplerin kıvrımlarının biraraya gelmesi ile yeni kan damarlarının oluşumu tamamlanmış olur (Redmer, Doraiswamy, Bortnem, Fisher, Jablonka-Shariff vd., 2001; Risau, 1997). Tümörlü dokularda anjiyogenik aktivite baskılanırsa besin gereksinimi ve atık maddelerin uzaklaştırılma döngüleri sağlanamayacağından dolayı tümör büyümesi 1-2 mm ile sınırlı kalır. Anjiyogenez kanser gelişiminde ve kanserin çevre dokulara yayılımında önemli bir mekanizmadır (Bamberger ve Perrett, 2002). Embriyonik dönemdeki damar sistemi gelişirken, burada gerçekleşen birçok olay erişkin bir organizmadaki anjiyogenez durumunda olduğu gibidir. Özellikle bu durum hipoksi durumunda gerçekleşen metabolik cevaplarla birçok yönden benzerlik gösterir (Folkman, 1997; Folkman ve Shing, 1992; Intaglietta, Johnson ve Winslow, 1996). İlk damar sisteminin gelişimi vaskülogenez olarak bilinir. Damarsal ağı oluşturmak üzere öncü endotelial hücreleri farklılaşırlar ve bu işlem hem embriyonik, hemde embriyo dışı mezoderm içerisini kapsar. Oluşan damar ağlarının yayılabilmesi ve değişimleri için yeni kapiller damarların oluşması gereklidir. Yine bu damarsal ağların, tomurcuklanması ve önceden oluşan damar ağının yeniden organize edilerek küçük ve büyük damarları

oluşturması ile süreç ilerlemektedir. Oluşan damarsal yapıların olgunlaşmaları için bazal membran üzerinde salınan çok sayıda faktörün varlığına ve perivasküler hücrelerin yeniden programlanmasına bağlıdır (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

HIF, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) reseptörleri FLT-1 (Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1) ve FLK-1 (Fetal liver kinase 1), plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1), trombosit kaynaklı büyüme faktörü B (PDGF-B), matris metaloproteinazlar (MMP-2 ve MMP-9), TIE reseptörü ve anjiyopoyetinler (ANG-1 ve ANG-2) dahil çok sayıda pro-anjiyogenik faktörün ekspresyonunu indükleyebilir. HIF tarafından aktive edilen tüm bu pro-anjiyogenik faktörler arasında, güçlü bir endotelial mitojen olan VEGF-A, birçok insan tümöründe yüksek oranda eksprese edildiği için en dikkate değer proteindir. Hem fizyolojik hem de patofizyolojik anjiyogeneze, HIF-1 $\alpha$  yolağının, VEGF gibi diğer pro-anjiyogenik faktörleri yukarı regüle ederek damar oluşumunun ana düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (Demirer, Ayten ve Taş, 2014; Lugano, Ramachandran ve Dimberg, 2019; Lv, Li, Zhang, Hu, Li vd., 2017).

Damar oluşum kaskadının her adımı HIF-1 tarafından desteklenir. Özellikle, VEGF izoformları (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D) anjiyogeneze katılan birincil faktörlerdir. HIF-1 tarafından başlatılan anjiyogeneze sıklıkla VEGF' e bağımlıdır çünkü HIF-1 vasküler endotelial büyüme faktörünün ana uyarıcısıdır (Jozsef Jaszai ve Schmidt, 2019; Ölgün, Bıçak ve Nebioğlu, 2002; Schito, 2018; Zimna ve Kurpisz, 2015). HIF-1 $\alpha$ , endotelial hücre (EC) biyolojisi ve anjiyogeneze önemli bir rol oynar. Tang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada EC hücrelerinden HIF-1 $\alpha$ ' nın susturulması sonucu HIF-1 $\alpha$  kaybının kemotaksis, proliferasyon, yer değiştirme ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere EC' nin anjiyogeneze davranışını önlediği gösterilmiştir (Tang, Wang, Esko, Giordano, Huang vd., 2004). HIF-2 $\alpha$ ' nın ise hücre proliferasyonu, göç, kan damarlarının olgunlaşması ve metastaz dahil olmak üzere anjiyogenezin birçok yönünü düzenlediği gösterilmiştir (Befani ve Liakos, 2018).

Tümör anjiyogenezi, premalign dönemlerde meydana gelen pro-anjiyogenik sinyallerle meydana gelir (Rundhaug, 2005). Tümör dokularında anjiyogenetik dengeyi çok sayıda faktör bozmaktadır. Bunlar arasında belirli onkogenleri aktive eden veya tümör baskılayıcı genleri inaktive eden genetik mutasyonlar, hipoksi ve asidozis gibi metabolik stresler, ayrıca tümör/lezyonlar içerisindeki immün/inflamatuvar yanıtların etkisi ile anjiyogenetik dengenin bozulması sayılabilir (Carmeliet ve Jain, 2000). Tümör dokusunun invaziv ve metastatik karakter kazanabilmesi için yeni kan damarlarının yapılmasına ihtiyaç vardır. Çünkü yeni kan damarlarıyla doku için gerekli besin maddeleri, oksijen ve büyüme faktörleri sağlanır. Salınan belli faktörlerle tümör hücresi anjiyogenezi uyarır. Tümör dokusunun daha fazla büyüebilmesi, invaziv ve metastatik karakter kazanabilmesi için anjiyogeneze şarttır (Demirer vd., 2014).

## 5. Kanserde Hipoksi

Hücrelere ve dokulara yetersiz oksijen gitmesinin bir durumu olan hipoksi, işlevsel olmayan vaskülatörler ve mevcut kaynağı aşırı hızla çoğalan kanser hücreleri nedeniyle neredeyse tüm katı tümör tiplerinde sıklıkla gözlenir. Tümörlerin içindeki hipoksik mikro ortamlar, radyoterapi ve birçok sitotoksik ilacın etkinliğini sınırlar (Yu vd., 2017). Kanser hücrelerinin hızlı çoğalması nedeniyle, tümör, normal damar sistemindeki besin ve oksijen kaynağını hızla tüketir ve hipoksik hale gelir. Hipoksik tümör bölgelerinden anjiyogenik faktörlerin üretimi, tümör kitlesinin vaskülarizasyonunu tetikler. Normal fizyolojik anjiyogeneze olduğu gibi pro- ve anti-anjiyogenik faktörlerin düzenlenmesi, vasküler sızıntıya ve laminer olmayan kan akışına yol açar. Bu da hipoksik tümör bölgeleri ile sonuçlanır. Bu nedenle, katı bir tümör, şiddetli hipoksi ve nekroz alanlarıyla doludur (Eales, Hollinshead ve Tennant, 2016). Patolojik olarak anjiyogenezin en önemli şekli kanserdir. Kanser hücreleri anjiyogeneze ile buldukları doku ve ortamdan başka doku ve organlara ulaşımı sağlarlar (Sevimli, Özçelik ve Sevimli, 2015).

Kanser; iltihaplanma, tümör gelişimi ve ilerlemesinde kilit oyuncudur, bu nedenle kronik iltihaplı hastalıkların kansere yakınlık oluşturduğu düşünülmektedir. Crohn hastalığı ve ülseratif koliti içeren İnflamatuvar Bağırsak

Hastalığı (IBD) kronik bir bağırsak hastalığıdır. Bu durumdan etkilenen hastaların kolon kanseri, özellikle Kolit-İlişkili Kolon kanseri (CAC) geliştirme riski daha yüksektir. Hipoksik inflamasyonun önemli olduğu kolon tümör oluşumunda hem HIF-1 $\alpha$  hem de HIF-2 $\alpha$  eksprese edilir (D'Ignazio, Batie ve Rocha, 2017).

Çeşitli çalışmalar, HIF' in karsinogenezde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Birincisi, HIF yaygın kanserlerin çoğunda aktive olur. HIF- $\alpha$  ekspresyonu çoğu normal dokuda seviyesi düşük iken, tümörlerde hem HIF-1 $\alpha$  hem de 2 $\alpha$  seviyeleri yükselir, farklı dokulardan gelen habis tümörlerin %54' ü her iki proteini de içerirler. Özellikle kan damarlarına uzak bölgelerde ve nekrotik hücrelerin sınırlarında, muhtemelen en şiddetli hipoksi altındaki hücrelerde aşırı eksprese edilirler. Bu değişikliğin, tümör hücrelerinin hipoksik ortama uyum sağlamasına yardımcı olduğu öne sürülmüştür. İkinci olarak, kültürlenmiş hücrelerde tanımlanan kanser ve HIF hedefleriyle ilişkili genlerin çarpıcı bir uyumu vardır. VEGF ve glikolitik enzimler, normal dokulara göre tümörlerde daha yüksek seviyelerde eksprese edilir (Liu ve Simon, 2004; Talks, Turley, Gatter, Maxwell, Pugh vd., 2000).

HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu, oksijenden bağımsız bir şekilde Src ve Ras onkogeninin büyüme faktörleri, sitokinler veya aktivasyonu ile indüklenebilir (Maxwell, Pugh ve Ratcliffe, 2001; Semenza, 2003). Buna, translasyon oranındaki artış aracılık eder. HIF aktivasyonu, hem kemoterapi ve radyoterapiye dirençte bir artış ile hem de artmış bir metastaz potansiyeli ve hasta mortalitesi ile ilişkilidir (Talks vd., 2000). HIF aşırı ekspresyonu genellikle artan ksenograf büyümesi sıklığı ile ilişkilidir. Baskın negatif HIF veya ARNT nakavt formlarının ekspresyonu yoluyla HIF inaktivasyonu, tümör büyümesinin azalmasına yol açar (Liu vd., 2004). Hipoksi, katı tümörlerde sıklıkla görülür ve tümör hücreleri, farklı oksijen eşiklerinde ortaya çıkan, çok sayıda heterojen değişikliğe yol açan farklı sinyal yollarını aktive ederek hayatta kalır. Aslında, kötü huylu büyüme sırasında, hipoksik bölgeler, artan genetik kararsızlık ve tümör metastaz riski ile ilişkili olan daha agresif fenotip ile ilişkilidir (Challapalli, Carroll ve Aboagye, 2017).

Tümör hücreleri HIF' i aktive etmek için farklı yollar geliştirmiştir. Örnekler arasında VHL ve PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, H-RAS ve c-MYC gibi onkogenlerin aktivasyonu ve IGF-1, IGF-2 ve PDGF gibi çeşitli büyüme faktörü yollarının artan aktivitesi yer alır (Maxwell vd., 2001).

## 6. HIF-1 $\alpha$ ' nın Transkripsiyonel Düzenlenmesi

HIF tarafından transaktivasyonu, HIF-1 $\alpha$ /ARNT' nin hedef genlerin promotorleri ve güçlendiricilerindeki HRE' lere bağlanması ile gerçekleşir. ARNT bir transkripsiyonel aktivasyon alanı içerirken, HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  iki transaktivasyon alanına, yani N- terminal (NAD) ve C-terminal aktivasyon alanları (CAD) içerir. NAD, ODD alanı ile örtüşür ve CAD, CBP/p300 gibi transkripsiyonel ortak aktifleştiricilerle etkileşime girer. İkincisi bir asparajinil hidroksilaz tarafından CAD da korunmuş amino asitler YDCEVNV/AP' de bir asparajin kalıntısının hidroksilasyonunun inhibisyonundan sonra meydana gelen O<sub>2</sub>' ye duyarlı bir etkileşimdir. Aynı zamanda inhibe edici faktör HIF-1 (FIH) olarak da bilinir. PHD' lere benzer FIH, aktivitesi kofaktör olarak O<sub>2</sub> gerektiren bir 2-oksoglutarat bağımlı dioksijenaz süper ailesine aittir. CBP/p300' e ek olarak, HIF; ortak aktifleştirici SRC-1 ve transkripsiyon aracı faktör 2 ile etkileşime girer. Bu etkileşim, HIF-1' in O<sub>2</sub>' ye bağlı bir şekilde transaktivasyon potansiyelini artırır ve özellikle düşük miktarda CBP ile sinerjik bir etki üretir. Ayrıca, HRE' lere HIF bağlanması, birçok gen için hipoksik indüksiyon da yeterli değildir. HIF-1 $\alpha$  veya HIF-2 $\alpha$  ile Smad3, HNF4, ATF1/CREB1, AP1 ve Ets-1 gibi diğer transkripsiyon faktörleri arasındaki sinerjik iş birlikleri bulunmaktadır. VEGF promotorunun optimal bir HIF1 $\alpha$ ' ya bağlı indüksiyonu Smad3 varlığında elde edilmiştir (Bracken, Whitelaw ve Peet, 2003; Liu vd., 2004).

HIF-1 $\alpha$ , yalnızca hipoksinin kendisine değil, aynı zamanda büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar, ısı şoku ve besin mevcudiyeti tarafından uyarılmaya da yanıt olarak, mRNA transkripsiyonu ve protein sentezi yoluyla da düzenlenebilir. ERK/MAPK, JAK/STAT ve PI3K/Akt/mTOR olmak üzere üç büyük yol, özellikle kanserde HIF-1 $\alpha$ ' nın transkripsiyonunu ve translasyonunu arttırmada görev yapar (Lommarini vd., 2017).

## 7. Deneysel Hipoksi Modelleri

### 7.1. Kimyasal Hipoksi

Hipoksik durumun moleküler mekanizmasında eritropoezi ve dolayısıyla kan O<sub>2</sub> taşıma kapasitesini düzenleyen ve büyüme faktörünü kodlayan EPO geninin transkripsiyonunun fizyolojik düzenleyicileri yada EPO ekspresyonunun indükleyicileri; %1 oksijen (O<sub>2</sub>), kobalt klorür (CoCl<sub>2</sub>) ve deferoksamin (DFO)' dir. Ayrıca EPO ekspresyonunun inhibitörleri aktinomisin D, sikloheksimid ve 2-aminopurin' dir. EPO ekspresyonu hücre tipine özgüdür, ancak HIF-1 aktivitesinin %1 O<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> veya deferoksamin ile indüklenmesi, birçok memeli hücre hattında tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada birkaç glikolitik enzimi kodlayan RNA' lar, EPO üreten Hep3B hücrelerinde ve üretmeyen HeLa hücrelerinde %1 O<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> veya deferoksamin ile indüklenirken, sikloheksimid bunların indüksiyonunu bloke etmiştir ve HIF-1 bağlanma bölgelerini içeren glikolitik gen sekansları, transfeksiyonda hipoksiyle indüklenabilir transkripsiyona aracılık etmiştir (Torres vd., 2017; Wang vd., 1995).

Hücre kültüründeki hipoksi modelleri, hücresel, biyokimyasal ve moleküler seviyelerde hipoksi yanıtının karakterizasyonuna izin vermiştir. Tablo 1, hipoksik koşulları indüklemek için kullanılan kimyasal maddeleri göstermektedir. En yaygın olarak kullanılan kimyasal hipoksi ajanları CoCl<sub>2</sub> ve demir şelatörü DFO' dir (Sanchez ve Cardenas, 2018).

Tablo 1

Kimyasal olarak indüklenmiş hipoksi modeli olarak kullanılan bileşikler (Sanchez ve Cardenas, 2018).

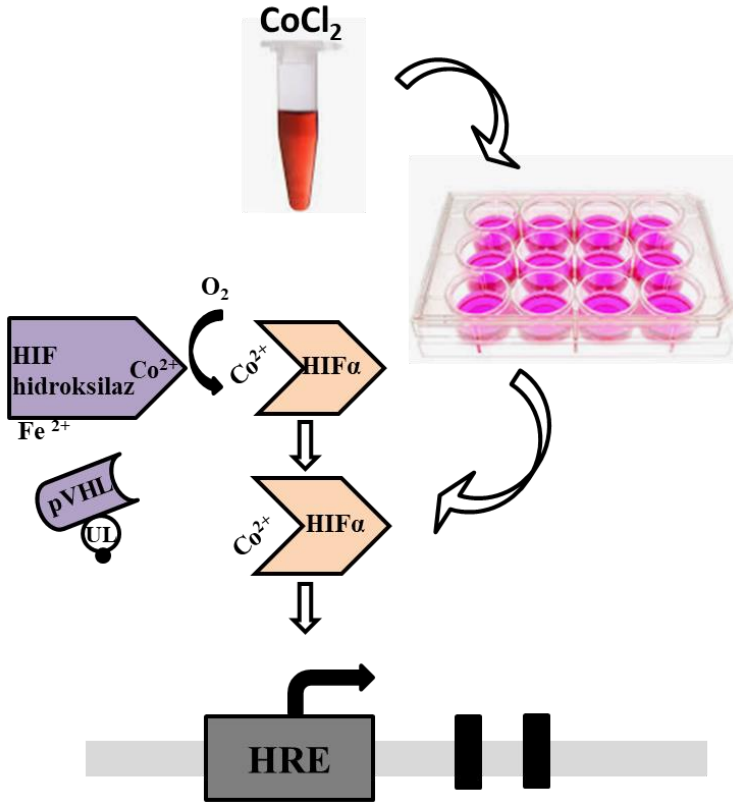
İnhibitör tipi	Kullanılan bileşik
Oksoglutaratın analogları	Dimetiloksaloglisin L -Mimosin Etil 3,4-dihidroksibenzoat S956711
Fe <sup>+2</sup> şelantlar	Deferoksamin 8-Hidroksikinolin M30 HLA-20 VK28
Metaller	Kobalt (Co <sup>+2</sup> ) Nikel (Ni <sup>+2</sup> ) Çinko (Zn <sup>+2</sup> ) Manganez (Mn <sup>+2</sup> ) Vanadyum (V <sup>+5</sup> )
Elektron taşıma zincirinin ayırıcısı	Dinitrofenol Dinitrokrezol Pentaklorofen m-Klorokarbonil siyanür Fenildirazon

#### 7.1.1 CoCl<sub>2</sub> ile Hipoksik Koşul

Doku kültüründe hücelere belirli konsantrasyonlarda CoCl<sub>2</sub> uygulanarak, kimyasal olarak hipoksik durum oluşturulabilmektedir. CoCl<sub>2</sub> ortamdaki prolin hidroksilazlara bağlanır ve prolin hidroksilaz enziminin HIF-1α' yı hidroksillemesini engeller. Hidroksilasyon olmadığı için tümör baskılayıcı protein VHL, HIF-1α'



ya bağlanamaz. HIF-1 $\alpha$  hücrede degrade olmadan aktif hale gelerek birikir ve hedef genlerin transkripsiyonu için promotorlarda bulunan HRE bölgesine bağlanır. (Yuan, Hilliard, Ferguson ve Millhorn, 2003). CoCl<sub>2</sub>, normoksik koşullar altında HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ ' yı güçlü bir şekilde stabilize eder. Düşük oksijen kaynaklı hipoksi ve diğer hipoksi taklitlerinin kullanımı ile karşılaştırıldığında, HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ ' nın stabilizasyonu birkaç saat sürdürülür. Bu nedenle, bu model kullanıcılara, numunelerini normoksik koşullar altında işlemek ve analiz etmek için daha geniş bir zaman aralığı sağlar. CoCl<sub>2</sub> ile hipoksik koşul oluşturma mekanizmasını göstermektedir (Şekil 3) (Sanchez vd., 2018). Literatürde bu kimyasalın kullanımına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Hatipoğlu, Hirohata, Cilek Ogawa, Miyoshi, vd., 2009; Okuyan, Turkoglu ve Kockar, 2020; Turkoglu ve Kockar, 2016; Turkoglu ve Kockar, 2012).



Şekil 3. CoCl<sub>2</sub> ile hipoksik koşul oluşturma ve mekanizması (Yuan vd., 2003' den esinlenerek çizilmiştir.)

### 7.1.2 DFO (Deferoksamin - Demir Şelatör) ile Hipoksik Koşul

Demir homeostazi normal hüce metabolizması için önemlidir ve eksikliği ya da fazlalığı birçok hastalık durumuna sebebiyet vermektedir. Elde edilen sonuçlara göre demir, hayvanlarda kolorektal tümörler, adenokarsinoma, hepatomalar, meme tümörleri, sarkomlar ve renal tübüler hücreli karsinom gibi kanserlerin patogenezinde rol oynayan kanserojen yada kofaktörler olarak bilinmektedir. Hemokromatoz demir metabolizması bozukluğudur. Hemokromatoz hastalarının vücutlarında, vücutlarının ihtiyaçlarından daha fazla demir birikir. Hemokromatozdan muzdarip hastalar çeşitli malignitelere karşı belirgin şekilde artan duyarlılık gösterir. Kanser gelişimi yada ilerlemesinde demirin patojenik rolü önemli ölçüde bilinmemektedir. Demir şelatör maddeleri *in-vitro*, *in-vivo* ve klinik çalışmalarda kayda değer önemli anti-tümör aktivitelere sahiptir. (Guo vd., 2006).

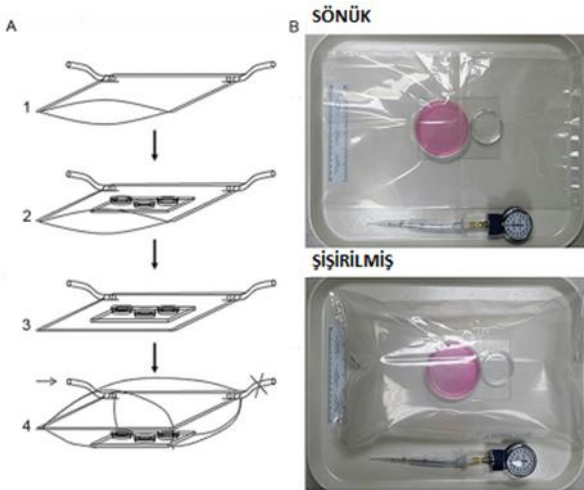
HIF-1 $\alpha$ ' nın proteozomal degradasyonu için hidroksillenmesi gerekmektedir. DFO, prolin hidroksilazları inhibe eder ve bu inhibisyon sonucu, bu süreci durdurmakta ve HIF-1 $\alpha$ ' nın birikimine sebep olmaktadır. DFO, HIF-1 $\alpha$  proteininin birikimini uyararak parçalanmasına engel olmaktadır. Deforoksamin ilacı son konsantrasyonu 100  $\mu$ M olacak şekilde hesaplanarak hücrelere uygulanmaktadır. Bu ilaçların deneylerde

pekçok kez açılarak kullanımı mümkün olup ekonomik ve kolaydır (Wu ve Yotnda, 2011). DFO ve kobalt HIF-1 $\alpha$ ' yı farklı mekanizmalar yoluyla stabilize etmektedir. DFO, HIF-1 $\alpha$ ' ya özgü prolinin aktivitesi için gerekli demiri şelatlayarak HIF-1 $\alpha$ ' nın hidroksilasyonunu inhibe eder. Bunun aksine, kobalt, translasyon veya bağlanma aşamasında eklendiğinde VHL bağlanmasını önler (Woo, Lee, Park ve Kwon, 2006).

## 7.2. Fiziksel Hipoksi

Hücre kültürü için hipoksik bir ortam yaratabilen ve koruyabilen güvenilir bir deneysel cihaz gereklidir. Böyle bir amaç için mevcut birkaç model vardır. Biri, %1 O<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub> ve %94 N<sub>2</sub> içeren düşük O<sub>2</sub> gazı ile doldurulabilen modüler inkübatör odasıdır. Oda, sabit bir şekil ve boyutta katı malzemelerden yapılmıştır ve son yıllarda araştırma laboratuvarlarında en yaygın kullanılan hipoksi odasıdır. Başka bir hipoksi modeli, bir hücre kültürü yetiştirme cihazı kullanmaktır. Bir diğeri ise, sıcaklık ve bağıl nemin yanı sıra O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>' nin hassas kontrolünü sağlayabilen hipoksi istasyonudur. Uzun vadeli bir hücre kültürü için hipoksik bir ortam sağlar. İkinci ve üçüncü modeller oldukça pahalıdır ve günlük olarak hipoksi deneyleri yapmayan küçük laboratuvarlar için uygun olmayabilir (Wang, Jin ve Zhong, 2014).

Bir diğeri inkübatör bazlı hipoksik koşul ise well plakalarında gerçekleştirilmektedir. Belirli bir miktara ulaşmış hücreler normoksik koşul için %21 hipoksik koşul için %1 O<sub>2</sub> olacak şekilde dengelenir. 16x16 inç boyutunda şişebilen hazneye konulur. Hava geçirmez plastik torba alt köşelerine bağlanmış iki gaz bağlantı noktaları ile hazır hale getirilir. Bir cam plaka, kültür kaplarına desteklik sağlamak için içerisine yerleştirilir. Otaklavlanmış su ile ıslatılmış sünger haznenin içine yerleştirilir. Kılıf gaz bağlantısı aracılığıyla yavaşça vakumlanır ve yalıtılmış bir alan oluşturmak için kapatılır. Hazne maksimum kapasitenin hemen hemen %80 dolulukta olacak şekilde belirlenmiş gaz ile, A bağlantı noktasından doldurulur. Şekil 4' de gösterildiği gibi gaz çıkışı olan B bağlantı noktası bir kelepçe ile kontrol edilir. Sızdırmayacak şekilde bağlantı noktalarına bakılarak kelepçeleri ile kapatılır ve hazne 37 °C de inkübasyona bırakılır. Atmosfer basıncını izlemek için monometre kullanılır. Hipoksik koşul için oksijen gazı N<sub>2</sub> ile dengelenir ve %5 CO<sub>2</sub> kullanılır. Gaz doldurulması sırasında gaz akışı 2psi tek kademeli regülatör ile kontrol edilmektedir. Hazne kapasitesinin %80' i doldurulur ve iki bağlantı noktası tamamen kapatılır. Belirli zaman aralıklarında bakılmak için önceden ayarlanmış 37 °C inkübatör içine yerleştirilir (Baysal, 2016; Wang vd., 2014).



Şekil 4. Şişirilebilir kapalı haznede hipoksik koşul modeli (Wang vd., 2014)

## 8. Sonuçlar

Kanserde, hücrelerinin sürekli ve hızlı çoğalması sebebiyle kanser hücreleri, damar sisteminde bulunan besin ve oksijen kaynağını tüketir. Oksijen seviyesinin normalin altına düşmesi sonucu hipoksik durum oluşur. Tümör hücreleri yeterli oksijen alamadığında hücre ölümüne gitmeden önce genetik farklılıklar oluşturarak hipoksik duruma adapte olmaktadır. Hücrelerde hipoksiden sorumlu olan HIF olarak bilinen protein ailesi

üyeleri özellikle hücre kültürü çalışmalarında kimyasal ve fiziksel olarak indüklenebilmektedir. Bu derleme, HIF'in moleküler çalışma mekanizmasını, hipoksinin biyolojik fonksiyonlarını ve hücre kültürü laboratuvarlarında kullanılan farklı hipoksi modellerini özetlemektedir.

### Yazar Katkıları

Sümeyye Aydoğan Türkoğlu: Çalışmanın dizaynı, gerekli tüm literatürün taranmasında ve makalenin yazımında katkı sağlamıştır.

Fatma Poyrazlı: Tüm literatürün taranmasında ve makalenin yazımında katkı sağlamıştır.

Derya Okuyan: Anjiyogenez ve hipoksi bölümünün şekillendirilmesinde katkı sağlamıştır.

Feray Köçkar: Derleme çalışmanın dizaynı ve tüm bölümlerin yeniden gözden geçirilmesinde katkı sağlamıştır.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

### Kaynaklar

- Bamberger, E. S. ve Perrett, C. W. (2002). Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, 55, 348-359. <https://dx.doi.org/10.1136%2Fmp.55.6.348>
- Baysal, S. (2016). *NonO/p54<sup>nrb</sup> Promotorunun Klonlanması ve Fonksiyonel Analizi* (Yüksek Lisans Tezi). Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Befani, C. ve Liakos, P. (2018). The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 9087–9098. <https://doi.org/10.1002/jcp.26805>
- Bracken, C. P., Whitelaw, M. L. ve Peet, D. J. (2003). The hypoxia-inducible factors: Key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 1376-93 <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-003-2370-y>
- Carmeliet, P. ve Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57. <https://www.nature.com/articles/35025220>
- Çekin, N. (2007). *HIF-1 Proteininin Kansere İlaçlarına Karşı Direnç Gelişmesindeki Rolünün Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/nilgüncekin>
- Challapalli, A., Carroll, L., Aboagye, E. O. (2017). Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. *Clinical and Translational Imaging*, 5, 225–253. <https://doi.org/10.1007/s40336-017-0231-1>
- D'Ignazio, L., Batie M., ve Rocha, S. (2017). Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF-κB. *Biomedicines*, 5(2), 21. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020021>
- Demirer, E., Ayten, Ö. ve Taş, D. (2014). Anjiyogenez ve Anti-Anjiyogenik Tedaviler. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 5(1), 75-9. <https://doi.org/10.4328/JCAM.1310>
- Dengler, V. L., Galbraith, M. D. ve Espinosa, J. M. (2013). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49, 1-15. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>
- Eales, K. L., Hollinshead K. ve Tennant, D. A. (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*, 5, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2015.50>
- Folkman, J. (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. In I.D. Goldberg ve E.M. Rosen (Ed.), *EXS Regulation of Angiogenesis* (pp. 1-8). Erişim adresi: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-9006-9\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-9006-9_1)
- Folkman, Y. ve Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *Journal of Biology Chemistry*, 267(16), 10931–10934. <https://www.sciencedirect.com/science/>
- Goldberg, M. P., Monyer, H. ve Choi, D.W. (1988). Hypoxic neuronal injury in vitro depends on extracellular glutamine. *Neuroscience Letters*, 94 (1-2), 52-57. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90269-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90269-8)
- Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., Bradfield C. A. (1998). Molecular Characterization and Chromosomal Localization of a Third α-Class Hypoxia Inducible Factor Subunit, HIF3α. *Gene Expression*, 7(3), 205-213. <https://www.ingentaconnect.com/>

- Guo, M., Song, L. P., Jiang, Y., Liu, W., Yu, Y. ve Chen, G. Q. (2006). Hypoxiamimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  independent mechanisms. *Springer Science Business Media*, 11, 67–77. <https://doi.org/10.1007/s10495-005-3085-3>
- Hatipoglu, O. F., Hirohata, S., Cilek M. Z., Ogawa, H., Miyoshi, T., Obika, M., Demircan, K., Shinohata, R., Kusachi, S. ve Ninomiya, Y. (2009). ADAMTS1 Is a Unique Hypoxic Early Response Gene Expressed by Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 24(284), 16325-16333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001313>
- Illingworth, C. J. R., Loenarz, C., Schofield, C. J. ve Domene, C. (2010). Chemical Basis for the Selectivity of the von Hippel Lindau Tumor Suppressor pVHL for Prolyl-Hydroxylated HIF-1 $\alpha$ . *Biochemistry*, 49(32), 6936-6944. <https://doi.org/10.1021/bi100358t>
- Intaglietta, M., Johnson, P. C. ve Winslow, R. M. (1996). Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovascular Research*, 32(4), 632–643. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(96\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)00110-1)
- Javan, B. ve Shahbazi, M. (2017). Hypoxia-inducible tumour-specific promoters as a dual-targeting transcriptional regulation system for cancer gene therapy. *Ecancermedicalscience*, 11, 751. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.751>
- Jozsef Jaszai, J. ve Schmidt, M. H. H. (2019). Trends and Challenges in Tumor Anti-Angiogenic Therapies. *Cells*, 8(9), 1102. <https://doi.org/10.3390/cells8091102>
- Konukoğlu, D. ve Turhan, M. S. (2005). Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Journal Medicine*, 36, 42-48. <https://www.academia.edu/>
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M.L. ve Bruick R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes and Development*, 16, 1466–1471. <http://doi.org/10.1101/gad.991402>
- Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H. ve Kim, K. W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine*, 36, 1-12. <https://doi.org/10.1038/emm.2004.1>
- Liu, L. ve Simon, M. C. (2004). Regulation of Transcription and Translation by Hypoxia. *Cancer Biology and Therapy*, 3(6), 492-497. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.6.1010>
- Lommarini, L., Porcelli, A. M., Gasparre, G. ve Kurelac, I. (2017). Non-Canonical Mechanisms Regulating Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7, 286. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00286>
- Lugano, R., Ramachandran, M. ve Dimberg, A. (2019). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>
- Ly, X., Li, J., Zhang, C., Hu, T., Li, S., He, S., Yan, H., Tan, Y., Lei, M., Wen, M. ve Zuo, J. (2017). The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genea and Diseases*, 4(1), 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.11.003>
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A. ve Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414, 550–554. <https://www.nature.com/articles/35107085>
- Martin, S. K., Diamond, P., Gronthos, S., Peet, D. J. ve Zannettino, A. C. W. (2011). The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia*, 25, 1533–1542. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2011.122>
- Maxwell, P. H., Pugh, C. W. ve Ratcliffe, P. J. (2001). Activation of the HIF pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics Development*, 11(3), 293-9. 36. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00193-3)
- Maxwell, P. H., Wiesener M. S., Chang, G. V., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher E. R. ve Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399, 271–275. <https://www.nature.com/articles/20459>
- Mungai, P. T., Waypa, G. B., Jairaman, A., Prakriya, M., Dokic, D., Ball, M. K., ve Schumacker, P. T. (2011). Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release- activated calcium channels. *Molecular and Cellular Biology*, 31(17), 3531–3545. <https://doi.org/10.1128/MCB.05124-11>
- Okuyan, D., Turkoglu, S. A. ve Kockar F. (2020). Carbonic anhydrase III is a new target of HIF1 $\alpha$  in prostate cancer model. *Gene*, 762, 145034. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145034>



- Ölgen, S., Bıçak, I. ve Nebioğlu, D. (2002). Angiogenesis ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(3), 193-214. <https://pdfs.semanticscholar.org/>
- Rankin, E. B. ve Giaccia, A. J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*, 15(4), 678–685. <https://www.nature.com/articles/cdd200821>
- Redmer, D. A., Doraiswamy, V., Bortnem, B. J., Fisher, K., Jablonka-Shariff, A., Grazul-Bilska, A. T. ve Reynolds, L. P. (2001). Evidence for a Role of Capillary Pericytes in Vascular Growth of the Developing Ovine Corpus Luteum. *Biology of Reproduction*, 65(3), 879-889. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.879>
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671-674. <https://www.nature.com/articles/386671a0>
- Rundhaug, J. E. (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 267-285. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x>
- Sanchez, J. M. ve Cardenas, M. E. C. (2018). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of Applied Toxicology*, 39, 556–570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>
- Schito, L. (2018). Bridging angiogenesis and immune evasion in the hypoxic tumor microenvironment. *The American Physiological Society*, 315, R1072–R1084. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00209.2018>
- Selvendiran, K., Bratasz, A., Kuppusamy, M. L., Tazi, M. F., Rivera, B. K. ve Kuppusamy P. (2009). Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *International Journal of Cancer*, 125(9), 2198–2204. <https://doi.org/10.1002/ijc.24601>
- Semenza, G.L. (1998): Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(5), 588-594. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80016-6](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80016-6)
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 3, 721-32. <https://www.nature.com/articles/nrc1187>
- Semenza, G. L., Neufeld, M. K., Chi, S. M. ve Antonarakis, S. E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5680-5684. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5680>
- Sevimli, T., Özçelik, N. ve Sevimli, M. (2015). Tümör anjiyogenezinde mikroRNA (miRNA)' ların rolü. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(1), 43-46. <http://eds.b.ebscohost.com/eds/pdfviewer/>
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. ve Adrian, L. H. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American Journal of Pathology*, 157, 411-21. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64554-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64554-3)
- Tameemi, W. A., Dale, T. P., Jumailyand R. M. ve Forsyth N. R. (2019). Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00004>
- Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., Gerber, H. P., Ferrara, N. ve Johnson, R. S. (2004). Loss of HIF-1 $\alpha$  in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell*, 6(5), 485e495. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.026>
- Tepebaşı, M. Y., Calaboğlu, N. Ş. (2016). Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) C111A gen polimorfizmi ile hemogloblin konsantrasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 23(2), 53-59. <https://dergipark.org.tr/en/pub/sdutfd/issue/26473/278673>
- Torres, J. F., Navaa, G. A. M., Ruiz M. C. G., Quiroz, L. E. G. ve Gutierrez, M. (2017). Role of HIF-1 $\alpha$  signaling pathway in osteoarthritis: a systematic review. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 57(2), 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2016.07.008>
- Turkoglu, S. A. ve Kockar F. (2012). Expression Of Gapdh, B-Actin And B-2-Microglobulin Genes Under Chemically Induced Hypoxic Conditions In Hep3b And Pc3 Cells. *Journal of Applied Biological Sciences*, 6(3), 1-6. <http://www.jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/306>
- Turkoglu, S. A. ve Kockar F. (2016). SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells. *Gene*, 575(1), 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.035>
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. ve Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 92(12), 5510-5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>

- Wang, R., Jin, F. ve Zhong, H. (2014). A novel experimental hypoxia chamber for cell culture. *American Journal of Cancer Research*, 4(1), 53-60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Woo, K. J., Lee, T. J., Park, J. W. ve Kwon, T. K. (2006). Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1 $\alpha$  accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.116>
- Wu, D. ve Yotnda, P. (2011). Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *Journal of Visualized Experiments*, 54, e2899. <https://dx.doi.org/10.3791/2899>
- Yeo, E. J. (2019). Hypoxia and aging. *Experimental & Molecular Medicine*, 51, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0233-3>
- Yu, T., Tang, B. ve Sun, X. (2017). Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Medical Journal*, 58(3), 489-496. <https://doi.org/10.3349/ymj.2017.58.3.489>
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T. ve Millhorn, D. E. (2003). Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- and von Hippel-Lindau 112 Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor- $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15911–15916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300463200>
- Zimna, A. ve Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/549412>