

## ÇEŞİTLİ HAYVAN FEÇESLERİNDE AUXİN HORMON (İNDOL ASETİK ASİT) POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Haluk Testereci<sup>1</sup> Hülya Sağmanlıgil<sup>2</sup> Ali Ertekin<sup>3</sup> İdris Türel<sup>4</sup>

### Researching Auxin Hormone (Indole acetic acid) Potential in Several Animal Feces

**Summary:** The aim of this study is to determine the potential of the plant growth hormone (auxin) in feces of sheep, goat and cow by HPLC.

The average IAA concentration in sheep, goats and cows are found as  $1070 \pm 198.6$  ng/g,  $729.5 \pm 107.4$  ng/g and  $4350 \pm 1172$  ng/g wet weight, respectively.

No significant differences for IAA concentration between sheep and cow feces were found. But, cow feces contain more IAA than sheep and goat feces ( $P < 0.05$ ).

IAA levels in feces were measured after 48 hours stored in an anaerobic conditions at  $+37^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ . The average IAA values for sheep, goats and cows were  $1.089 \pm 0.02$   $\mu\text{g/g}$ ,  $0.985 \pm 0.06$   $\mu\text{g/g}$  and  $1.531 \pm 0.02$   $\mu\text{g/g}$  wet weight at  $-20^{\circ}\text{C}$ , respectively. The average IAA values for sheep, goat and cow were  $1.089 \pm 0.02$   $\mu\text{g/g}$ ,  $6.478 \pm 0.46$   $\mu\text{g/g}$ ,  $6.376 \pm 0.73$   $\mu\text{g/g}$  and  $4.736 \pm 0.29$   $\mu\text{g/g}$  wet weight at  $+37^{\circ}\text{C}$ , respectively.

IAA levels at  $+37^{\circ}\text{C}$  of sheep, goat and cow were found to be increased significantly ( $P < 0.0001$ ). No significant differences for IAA values between sheep and goat feces stored at  $37^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$  were determined. IAA levels between feces of small ruminants and large ruminant stored at  $37^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$  were found to be significant (at least  $P < 0.05$ ).

IAA levels are increased approximately 300-600 % ratios by effect of the bacteria and heat.

**Özet:** Bu araştırmanın amacı koyun, keçi ve sığır gaytasındaki bitki büyüme hormonu (auxin hormon) potansiyelini HPLC ile belirlemektir.

---

1:Yrd. Doç. Dr. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya-Fizyoloji Anabilim Dalı , Van-TÜRKİYE

2:Yrd. Doç. Dr. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı , Van-TÜRKİYE

3:Arş. Gör. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya-Fizyoloji Anabilim Dalı , Van-TÜRKİYE

4:Arş. Gör. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı , Van-TÜRKİYE

Ortalama indol asetik asit konsantrasyonu koyunda, keçide ve sığırdaki sırasıyla  $1070 \pm 198.6$  ng/g,  $729.5 \pm 107.4$  ng/g ve  $4350 \pm 1172$  ng/g yaş madde olarak bulunmuştur.

Koyun ve keçi feçesinde indol asetik asit konsantrasyonları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Fakat sığır feçesi koyun ve keçi feçesinden daha fazla indol asetik asit ihtiva ettiği bulunmuştur ( $P < 0.05$ ).

Feçesler  $+37^{\circ}\text{C}$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$  de 48 saat oksijensiz ortamda saklandıktan sonra IAA değerleri ölçüldü.  $-20^{\circ}\text{C}$  saklanan koyun, keçi ve sığır feçeslerindeki ortalama IAA miktarları sırasıyla  $1.089 \pm 0.02$  µg/g,  $0.985 \pm 0.06$  µg/g ve  $1.531 \pm 0.02$  µg/g yaş ağırlık olduğu bulundu.  $+37^{\circ}\text{C}$  de saklanan koyun, keçi ve sığır feçesindeki ortalama IAA miktarları sırasıyla  $6.478 \pm 0.46$  µg/g,  $6.376 \pm 0.73$  µg/g ve  $4.736 \pm 0.29$  µg/g yaş ağırlık olduğu tesbit edildi.

Koyun, keçi ve sığır feçeslerinin IAA düzeyi  $+37^{\circ}\text{C}$ 'de önemli derecede arttığı bulunmuştur ( $P < 0.0001$ ).  $+37^{\circ}\text{C}$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$  saklanan koyun-keçi feçeslerinin IAA değerleri arasında önemli bir farklılık tesbit edilememiştir.  $+37^{\circ}\text{C}$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$  saklanan küçük ruminantlar ile büyük ruminantların feçesleri arasındaki IAA değerleri için farklılık anlamlı bulunmuştur (en az  $P < 0.05$ ). IAA düzeyleri ısı ve bakteriyel etki ile yaklaşık %300-600 oranında artmıştır.

## Giriş

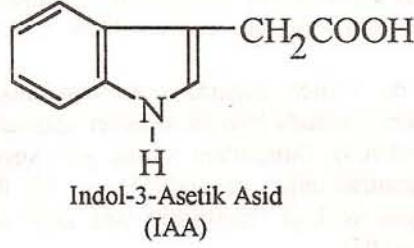
Indol-3-asetik asit (IAA) bitkilerin büyüme ve gelişme hormonu (auxin hormon)olarak bilinir. IAA'nın insan idrarında, mayadan, mantar (Rhizopus suinus)dan, ve bitkilerde varlığı gösterilmiştir (1, 3, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 15).

Indol-3-asetik asit triptofanın son yıkılma ürünü 5-hidroksi indol asetik asit ve indolpiruvat'ın dekarboksilasyonu ve oksidasyonu ile oluşur. Indol-3-asetik asit idrar ve feçesle atılır. Triptofan amino asidi memelilerde başlıca iki yolla parçalanır: Bu yollardan birisinde triptofan,5-hidroksitriptofan'a oksitlenir, bunu takiben 5-hidroksi triptamin'e (serotonin) dekarboksile olur. Sindirim sistemindeki bazı bakterilerde triptofanı triptamine dekarboksile eder ve daha sonra oksidasyonla indol-3-asetik asit oluşur (4, 8, 10, 15).

IAA'nın tanısında önceleri biyolojik ve kağıt kromatografisi teknikleri (4) kullanılmışsa da, son zamanlarda gaz kromatografisi (GC) (8, 9 ), GC mass spektrofotometri (9, 14, 17) ve HPLC (6, 7, 16, 17, 18) teknikleri ile IAA 'nın analizleri yapılmıştır.



İndol-3-asetik asit 'in tanısı, indol çekirdeğinin fluoresan dedektörde 280 nm eksitasyonu ve 360 nm yaydığı emisyonla ölçülebilmektedir (15, 17, 18).



### Materyal ve Metot

**Örneklerin hazırlanması:** Aynı merada otlayan ve akşam ağıla dönen 8 adet yerli sığır, 13 adet Akkaraman koyun ve 13 adet yerli kıl keçisinin taze feçesi alındı. Toplanan örnekler analiz edilmeden önce -30 °C de saklandı ve ertesi gün analiz edildi.

300-1000 mg arasında tartılan feçesler 2 ml mobil faz eklenip, vortex ile homojenize oluncaya kadar karıştırıldı. Kaba partiküller süzildükten (Whatman # 42) sonra, 4000 rpm devirde 15 dakika santrifüj edildi. Üsteki berrak sıvı filtre edilip, 20 µl 'si alınıp kolona enjekte edildi.

Koyun, keçi ve sığır feçeslerinden dokuz adet alındı. Aynı türlere ait numuneler homojenize edildi ve iki ana guruba ayrıldı. Her gurup kendi arasında tekrar dokuz bölündü. Her tür için 9 numune -20°C de, diğer 9 numunede +37°C de etüvde kapalı tüplerde 48 saat saklandı. Her türe ait IAA ekstraksiyonu yukarıda izah edildiği şekilde yapıldı ve konsantrasyonları okundu.

**Standart:** 400 mg IAA (İndol-3-asetik asit) (Sigma Chem Co. St louis) etanolde çözündürüldü. 120 ng/ml 'ye ulaşıncaya kadar sulandırıldı.

**Mobil faz:** Mobil faz olarak çift distile su ile pH 6.95 olacak şekilde 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de % 10 luk etanol hazırlandı. Mobil faz kullanılmadan önce filtereden geçirilip (Millipor, 0.45) vakum altında degaz edildi.

**Kromatografi:** Mobil faz LC-10 AD model HPLC pompa (Shimadzu, Japan) ile 1ml/min lik bir akış hızında izokratik olarak kullanıldı.

Numuneler Rheodyne 7124 injeksiyon valvından verildi. Shimadzu RF-10A model spektrofotometrik dedektör ile eksitasyon 280 ve emisyon 360 nm' de okundu.

Numuneler C<sub>18</sub> kolonda (150x4.6 mm, Shimadzu, Japan) ve oda ısısında ayrıldı. Sonuçlar C-R6A model kromatopak integrator (Shimadzu) tarafından hesaplandı.

### Tartışma ve Sonuç

Sığır, keçi ve koyunların feçeslerinin tam kromatogramları şekil 1'de gösterilmiştir. Feçeslerdeki IAA'nın kromatogramda tutulma zamanı 1.9 dakika

olarak bulunmuştur. Bu tutulma zamanı ile numunelerin ard arda kısa sürede okunabilmesine imkan tanınmıştır.

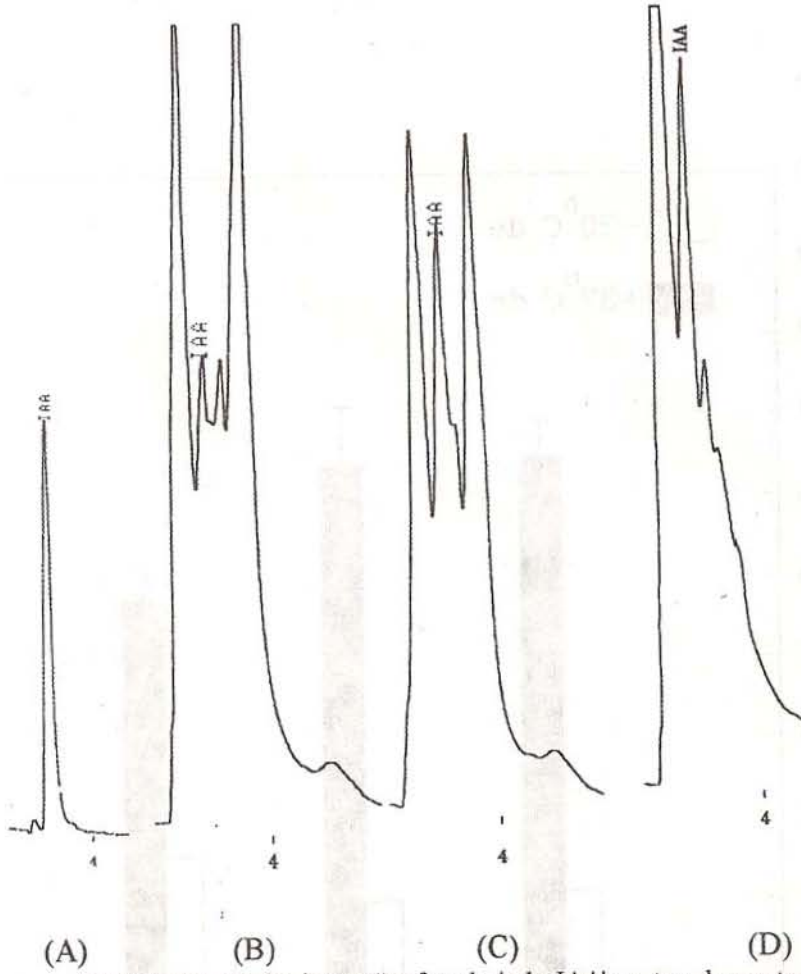
Koyun, keçi ve sığır feçeslerine ait IAA miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir. İndol asetik asit konsantrasyonu koyunda ortalama  $1070 \pm 198.6$  ng/g, keçide  $729.5 \pm 107.4$  ng/g , sığırdaki  $4350 \pm 1172$  ng/g yaş ağırlık olarak bulunmuştur.

Tablo 1'de verilen değerlerin varyans analizinde (ANOVA)(2), auxin hormon konsantrasyonunda hayvan feçesleri arasında önemli bir farklılık olduğu ortaya çıktı ( $P<0.003$ ). Duncan'ın testine göre koyun ve keçi feçeslerinin indol asetik asit konsantrasyonları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır Fakat sığır feçesi koyun ve keçi feçesinden daha fazla indol asetik asit ihtiva ettiği bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Yukardaki bulgular ışığında feçeslerin bitki büyüme hormon potansiyeli incelendiğinde, koyun ve keçi arasında bir fark yoktur. Halbuki sığır feçesi ihtiva ettiği yüksek IAA konsantrasyonu, daha fazla bitki büyüme hormonu ihtiva etmektedir. Kısaca sığır feçesi taze olarak kullanılacak olursa daha fazla gübre potansiyeline sahiptir. Feçesteki indol asetik asit konsantrasyonuna, feçesi oluşturan hayvansal, bitkisel ve bakteriyel indol kaynakları katkıda bulunmaktadır. Feçesteki IAA'nın kaynağının tesbiti daha ileri çalışmaları gerektirmektedir. Bu çalışmada feçese karışan bitkisel IAA kaynağı, hayvanların aynı merada otlamış olmasına dikkat edilerek, hayvanlar arasındaki bitkisel IAA kaynağı sabit tutulması düşünülmüştür. Taze feçeste IAA tesbit etmekle de, bakteriyel faaliyetlere bağlı oluşabilecek IAA düzeyleri sabit tutulmaya çalışılmıştır.

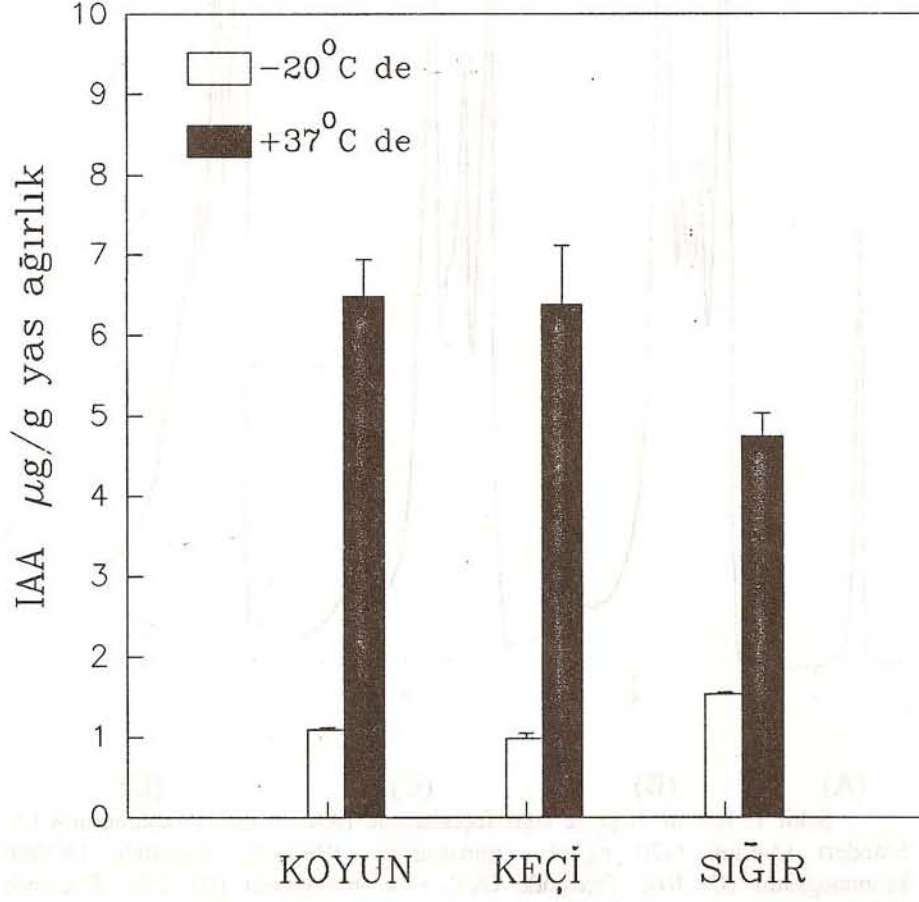
Tablo 1. Koyun, keçi ve sığır feçeslerine ait IAA miktarları (ng/ g yaş ağırlık)

n	Koyun	Keçi	İnek
1	1058	497	9059
2	605.7	419.2	7129
3	851.9	547.1	8265
4	1580	573.8	3856
5	664.4	360.5	2304
6	847.9	362.2	715
7	912.7	705.1	1331
8	2887	614.9	2139
9	322.5	434.9	
10	702.5	1127	
11	2113	968.9	
12	623.8	1847	
13	736.2	1475	
X	1070	729.5	4350
SE	198.6	107.4	1172



(A) (B) (C) (D)

Şekil 1. Koyun, keçi ve sığır feçeslerinde IAA'nın tam kromatogramı (A) Standart IAA'nın (120 ng/ml) kromatogramı (B)Koyun feçesinde IAA'nın kromatogramı (C) Keçi feçesinde IAA'nın kromatogramı (D) Sığır feçesinde IAA'nın kromatogramı. IAA'lar C<sub>18</sub> kolonunda 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH:6.95)-Metanol (90:10) mobil fazıyla ayrılmıştır. Tanılar fluoresan detektörde 280 nm eksitasyon ve 360 nm emisyonunda yapılmıştır.



Şekil 2. Koyun, keçi ve sığır feçeslerinin -20°C ve +37°C de 48 saat inkübasyondan sonraki IAA hormon konsantrasyondaki değişimi .



Bakteriyel faaliyetlerin, feçesdeki indol kaynağına etkisini araştırmak amacıyla homojenize edilmiş aynı tür hayvanlara ait feçeslerden bir gurup -20°C'de, diğer gurupta +37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bunlara ait IAA değerleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

Derin dondurucuda (-20°C) saklanan koyun, keçi ve sığır feçesindeki ortalama IAA miktarları sırasıyla 1.089 ±0.02 µg/g, 0.985 ±0.06 µg/g ve 1.531 ±0.02 µg/g yaş ağırlık olduğu bulundu. +37°C'de saklanan koyun, keçi ve sığır feçesindeki ortalama IAA miktarları sırasıyla 6.478 ±0.46 µg/g, 6.376 ±0.73 µg/g ve 4.736 ±0.29 µg/g yaş ağırlık olduğu tesbit edildi.

Yapılan t-testi sonucunda Koyun, keçi ve sığır feçeslerinin IAA düzeyi +37°C'de önemli derecede arttığı bulunmuştur (P<0.0001). +37°C ve -20°C saklanan koyun-keçi feçelerinin IAA değerleri arasında önemli bir farklılık tesbit edilememiştir. +37°C ve -20°C saklanan küçük ruminant ile büyük ruminantların feçesindeki IAA değerleri arasındaki farklılık önemli bulunmuştur (en az P<0.05). Bu değerler, feçeslerin ısıya maruz bırakılmasıyla IAA düzeylerinin en az 48 saat sonra yaklaşık %300-600 oranında bir artış olmaktadır. Bu artışın nedeni feçeste devam eden bakteriyel veya enzimatik sindirime bağlanabilir.

### Kaynaklar

1. Breviario D., Giani, S., Divietri, P., Coraggia, I. (1992): *Auxin and Growth Regulation of Rice Coleoptile Segments*, *Plant Physiol.*, **98**, 488-495.
2. Cochran, W. G., Cox, G. M. (1950): *Experimental designs*. 2nd Ed. John Willey & Sons. New York. p.1-611.
3. Franssen, J. M., (1992): *Methods to Determine ABA and IAA and Determinations of These Hormones in Tulip CV. Apeldoorn Bulbs as Related to the Cold-Treatment*, *Acta Horticulture*, **267-277**.
4. Jacobs, W. P., (1979): *Plant Hormones and Plant Development*. Cambridge University press, pp1-334.
5. Kim, R., K., (1985) : *Trace Enrichment of IAA3 from Leaf Matrix*, *J. Chromatography*, **325**, 127-136.
6. Lebuhn, M., Hartmann, A., (1993): *Method for the Determination of Indol-3-acetic Acid and Related Compounds of L-Tryptopan Catabolism in Soils*, *J. Chromatography*, **629**, 255-256.
7. Lee, T.T., Starratt, A. N., Jevnikar, J. J., (1985): *Separation of Conjugates and Oxidative Metabolites of IAA by HPLC*, *J. Chromatography*, **325**, 340-345.
8. Macmillan J., (1980): *Hormonal Regulation of Development I and II*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York , **9**, pp 1-534.
9. Meuwly, P., Pillet, P.A., (1991): *Simultaneous GC-Mas Spectrometry Quantification of Endogenous [12C]-and Applied [13C] IAA Levels in Growing Maize Roots*, *Plant Physiol.*, **95**, 179-183 .
10. Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V. W. ( 1993): *Hormonlar . Harper'un Biyokimyası. Çevirenler; Menteş, G., Ersöz ,B . Barış Kitabevi ,İst. 570-666.*

11. Pilet, P.E., Meuwly, P.(1986): *Local Application of indole-3- acetic acid,by resin beads to intact growing maize roots.* **169,16-22.**
12. Plummer, J., A., Mullins, M., G., Vine, J., H.,(1991): *Seasonal Changes in Endogenous ABA and IAA and the influence of applied ABA and auxin in relation to shoot growth and abscission in Valencia Orange,* **Plant Growth Regulation, 10, 139-151.**
13. Rodriguez, A., Sanchez-Tames, R.(1984) :*Dormancy and Seasonal Changes of Plant Growth Regulators in Hazel Buds.* **Physiol. Plant. 66, 288-292 .**
14. Roni, A., Tollier, M.T., Monties, B.,(1990):*The Role of Auxin and Gibberellin in Controlling Lignin Formation in Primary Phloem Fibers and in Xylem of Coleus blumei Stems,* **Plant Physiol., 94, 1743-1747.**
15. Skrinska, V., Hahn, S.,(1984): *HPLC of 5 hydroxyindole-3-acetic acid in urine with direct sample injection,* **J. Chromatography, 311, 380-384.**
16. Sundberg, B.,(1993): *The relationship between crown size and ring width in Pinus sylvestris L. stems: dependence on IAA3, carbohydrates and nitrogen in the cambial region,* **Tree Physiology, 12, 347-362.**
17. Tusell, J.M., Artigas, F., Surol, C., Martinez, E., Gelpi, E.,(1984): *Comparison of HPLC and GC- mas spectrometry for the analyses of IAA in brain tissue,* **J. Chromatography, 306, 338-344.**
18. Yamada, J., Sugimoto, Y., Horisaka, K., (1984): *Simultaneous determination of tryptamin and its metabolites in mouse brain by high-performance liquid chromatography with Fluoremetric detection,* **J. Chromatography, 311, 385-389.**