



EJBCS

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

Cilt:3 Volume: 1 Year: 2020

e-ISSN 2651-5237



EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Cilt: 3 Volume: 1 Year: 2020

Published Biannually

Corresponding Address

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

E-mail: mtdogan1@gmail.com

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

Editor in Chief

Prof. Dr. Muhittin DOĞAN

Editor (Associate)

Assist. Prof. Dr. Muhammet DOĞAN

Editorial Board

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ

Prof. Dr. Anna PEKSA

Prof. Dr. Elif LOLOĞLU

Prof. Dr. Elif ÖZTETİK

Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL

Prof. Dr. Issa SHARİFPOUR

Prof. Dr. İsmet YILMAZ

Prof. Dr. Osman GÜLNAZ

Prof. Dr. Osman Selçuk ALDEMİR

Prof. Dr. Vladimer TSITSISHVILI

Prof. Dr. Zeliha SELAMOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Erol ATAY

Assoc. Prof. Dr. Gökhan NUR

Assoc. Prof. Dr. H. Ahmet DEVECİ

Assoc. Prof. Dr. Şenay UĞUR

Assoc. Prof. Dr. Utku AVCI

Assist. Prof. Dr. Mustafa PEHLİVAN

Dr. Ardalan PASDARAN

Dr. Eva URGEOVÁ

Hatay Mustafa Kemal University, Turkey

Wrocław University, Poland

Gazi University, Turkey

Eskisehir Technical University, Turkey

İnönü University, Turkey

Iranian Fisheries Research Organization, Iran

İnönü University, Turkey

Cukurova University, Turkey

Adnan Menderes University, Turkey

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia

Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey

Hatay Mustafa Kemal University, Turkey

Gaziantep University, Turkey

Gaziantep University, Turkey

Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey

Recep Tayyip Erdoğan University, Turkey

Gaziantep University, Turkey

Shiraz University, Iran.

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

Language Editor

Assist. Prof. Dr. Demet DOĞAN

Gaziantep University, Turkey

Technical Editor

Assist. Prof. Dr. Mustafa SEVİNDİK

Owner / Publisher

Muhammet DOĞAN

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

All responsibility of the articles belongs to the authors.

e-ISSN 2651-5237



EJBCS

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Cilt: 3 Volume: 1 Year: 2020

Contents / İçindekiler

Research Articles / Araştırma Makeleleri

Studies on Anticholinesterase and Antioxidant Effects of Samples from *Iris* L. Genus of Turkish Origin 1-5

Duygu SEVİM, Bilge ŞENER

Isolation and Identification of Cholinesterase Inhibitors from the Bulbs of *Iris pseudacorus* L. 6-9

Duygu SEVİM, Bilge ŞENER

Optimization of a chromatographic method for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples 10-14

Selman KANDER, Belgin İZGİ

Antimicrobial activity of *Drosera peltate* J.E.Sm extracts against clinically isolated human cariogenic pathogens-an *in vitro* study 15-18

Raju ASİRVATHAM, Praveen RAJ R

The First Records of Three Moths Species (Lepidoptera) in Osmaniye Province of Turkey and Notes on External and Genital Morphology of The Species 19-25

Erol ATAY, Yusuf HÜSEYİNOĞLU, Mahmut TATLI

The synthesizing of defatted chia- chitosan beads for drug delivery 26-30

Beyza ARDA, Simge ZENGİN, Burcu OKUTUCU

Hatay İli Arsuz Bölgesi Topraklarının pH, Kireç, Organik Madde ve KDK İçeriklerinin Belirlenmesi 31-37

Rızkullah Cemil GÖKPINAR, Mehmet YALÇIN

Synthesis of Bionanocomposite Films with PLA/Halloysite 38-41

Sevil Begüm KARAKAŞ, Mehmet Burçin PİŞKİN, Nurcan TUGRUL

Utilization of hydrothermal process water for microalgae growth 42-47

Seray ZORA TARHAN, Anıl Teyfik KOÇER, Didem ÖZÇİMEN, Iskender GÖKALP

Kazdağları Bölgesine Ait Zeytin, Zeytin Yaprağı ve Zeytinyağlarının Element Tayini ve Metot Validasyonu 48-54

Serpil KILIÇ

Investigation of *In Vitro* Antioxidant Activity of *Glycyrrhiza glabra* and *Syzygium aromaticum* Extracts 55-58

Zerrin KUTLU, Fadime DUMLU, Özlem AYDIN BERKTAŞ, Fehmi ODABASOGLU

Sıçanlarda Metformin Kullanımının Karaciğer Dokuları Üzerine Morfolojik Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopisi ile Değerlendirilmesi 59-64

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

Review Articles / Derleme Makaleler

Abiyotik Strese Karşı Tohuma Manyetik Alan Uygulaması: Manyetoşartlandırma 65-69

Uğur SEVİLMİŞ, Deniz SEVİLMİŞ, Mehmet Emin BİLGİLİ

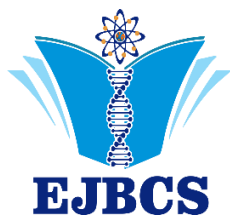
Ruminantlarda Tildipirosin Kullanımı 70-73

Devran COŞKUN, Enver YAZAR

Short Communication / Kısa Not

Archaea: an all-out study 74-77

Abolfazl JAFARI-SALES, Majid BASERI-SALEHI



Studies on Anticholinesterase and Antioxidant Effects of Samples from *Iris L.* Genus of Turkish Origin

Duygu Sevim^{1*} , Bilge Şener¹ 

¹Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Ankara, Turkey

*Corresponding author : duygusvm@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-3987-2466>

Received : 06/08/2019
Accepted : 07/01/2020

Abstract: The genus *Iris L.* (Iridaceae) is a member of geophytes with attractive flowers. There are about 56 *Iris* taxa growing in Turkey, 24 of which are endemic. A survey of the literature indicates that the research carried out on *Iris* species are focused on the flavonoid and volatile compounds of the plant.

In present study, the dichloromethane and methanol extracts prepared from the rhizomes of 47 *Iris* taxa growing in Turkey were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory effects against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) which the enzymes linked to Alzheimer's diseases and antioxidant capacities using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test as well.

The *Iris* extracts studied have been found more active against BChE than AChE. compared with 100 µg/ml galanthamine (89.29 ± 0.96 %) as reference, *Iris kerneriana* (coded as Y122) and *Iris pseudacorus* (coded as Y131) methanol extracts had significant BChE inhibition effect (respectively, 80.22 ± 1.04 % and 53.06 ± 1.13 %) at concentration of 200 µg/ml. Among tested samples, methanol extracts of *I. kerneriana*, *I. lazica*, *I. pseudacorus* and *I. suaveolens* have shown remarkable antioxidant activity at concentration of 2 mg/ml for DPPH compared with gallic acid.

Keywords: *Iris*, Anticholinesterase, Antioxidant, Activity

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Turkey is an important gen centers for biodiversity and it is known that Turkey possesses approximately 1045 geophyte taxons are economically important such as *Colchicum*, *Fritillaria*, *Hyacinthus*, *Lilium*, *Nectaroscordum*, *Polygonatum*, *Tulipa* and *Iris* species (Kaya, 2014). Among them, genus *Iris* (family *Iridaceae*) is represented by 56 species in Turkey, of which 24 are endemic (Güner, 2012). *Iris* species have gained great popularity in the perfume and cosmetic industries due to their sweet fragrance alongwith their ornamental purposes (Orhan et al. 2002; Atta-ur-Rahman et al. 2004; Sevim, 2018). *Iris* species have been previously recognized as rich sources of secondary metabolites and used in the treatments of cancer, inflammation and bacterial and viral infections (Wang et al. 2010; Singab et al. 2016). Previous phytochemical investigations on the *Iris* species have resulted in the isolation of a variety of compounds including flavonoids, isoflavonoids, isoflavonoid glycosides, benzoquinones,

triterpenoids and stilbene glycosides and essential oils (Orhan et al. 2002; 2003, Atta-ur-Rahman et al. 2002; 2003; 2004).

The aim of the present study was to investigate the antioxidant capacities and anticholinesterase activities of 47 *Iris L.* species growing in Turkey in order to evaluate their medicinal value and to point to an easily accessible source of natural antioxidants that could be used as a possible food supplement in addition to cosmetic, and perfume industries.

2. Materials and Method

2.1. Plant material

The rhizomes of *Iris L.* species were collected from different locations in Turkey given in Table 1. Their identification was confirmed by Prof. Dr. Neriman Ozhatay and Prof. Dr. Adil Güner and preserved as *ex-situ* at Atatürk Horticultural Central Research Institute, Department of Ornamental Plant Breeding and Agronomy in Yalova, Turkey.

Table 1. Population Number and Sample Codes of *Iris* Taxa

Sample Codes	Name of Taxa	Population Number
Y139	<i>Iris albicans</i> Lange	3505
Y103	<i>Iris aucheri</i> (Baker) Sealy	2105
Y111	<i>Iris bakeriana</i> Foster	4710
Y102	<i>Iris barnumiae</i> Foster & Baker	6507
Y112	<i>Iris caucasica</i> Hoffm. subsp. <i>caucasica</i>	2507
Y140	<i>Iris caucasica</i> Hoffm. subsp. <i>turcica</i> B. Mathew	2404
Y108	<i>Iris danfordiae</i> (Baker) Boiss. *	5104
Y119	<i>Iris elegantissima</i> Sosn.	3602
Y141	<i>Iris galatica</i> Siehe *	5201
Y113	<i>Iris gatesii</i> Foster	4702
Y115	<i>Iris germanica</i> L.	4802
Y114	<i>Iris germanica</i> L.	4605
Y142	<i>Iris histrio</i> Rchb. f.	2702
Y116	<i>Iris histrio</i> Rchb. f.	2704
Y117	<i>Iris histrioides</i> (G. F. Wilson) S. Arnott *	5304
Y120	<i>Iris junonia</i> Schott & Kotschy ex Schott *	0101
Y122	<i>Iris kerneriana</i> Ascherson & Sint. ex Baker *	3702
Y123	<i>Iris kirkwoodiae</i> Chaudhary	3106
Y124	<i>Iris lazica</i> Albov	5303
Y118	<i>Iris lycotis</i> Woron.	3001
Y126	<i>Iris masia</i> Dykes subsp. <i>masia</i>	6302
Y127	<i>Iris nectarifera</i> Güner var. <i>nectarifera</i> Güner *	4706
Y128	<i>Iris nezahataiae</i> Güner & H. Duman *	0802
Y129	<i>Iris orientalis</i> Miller	1001
Y130	<i>Iris pamphylica</i> Hedge *	0706
Y109	<i>Iris paradoxa</i> Steven f. <i>choschab</i>	6512
Y100	<i>Iris persica</i> L.	0201
Y131	<i>Iris pseudacorus</i> L.	3108
Y143	<i>Iris pseudacorus</i> L.	3405
Y101	<i>Iris pseudocaucaucasica</i> Grossh.	4406
Y110	<i>Iris pumila</i> L. subsp. <i>attica</i> (Boiss. & Heldr.)	1401
Y132	<i>Iris purpureobracteata</i> B. Mathew & T. Baytop *	5401
Y104	<i>Iris reticulata</i> M. Bieb var. <i>reticulata</i>	2403
Y107	<i>Iris sari</i> Schott ex Baker *	1802
Y134	<i>Iris schachtii</i> Markgraf *	1804
Y144	<i>Iris sibirica</i> L.	7503
Y133	<i>Iris sintenisii</i> Janka subsp. <i>sintenisii</i>	3406
Y145	<i>Iris sprengeri</i> Siehe *	6805
Y135	<i>Iris spuria</i> L. subsp. <i>musulmanica</i> (Fomin) Takht.	2408
Y106	<i>Iris stenophylla</i> Hausskn. ex Baker subsp. <i>stenophylla</i> *	7003
Y105	<i>Iris stenophylla</i> Hausskn. ex Baker subsp. <i>stenophylla</i> *	0702
Y147	<i>Iris stenophylla</i> Hausskn. ex Baker subsp. <i>stenophylla</i> *	7005
Y137	<i>Iris suaveolens</i> Boiss. & Reut.	3401
Y146	<i>Iris taochia</i> Woronow ex Grossh. *	2505
Y136	<i>Iris unguicularis</i> Poir. subsp. <i>carica</i> (Wern. Schulze) var. <i>carica</i> *	0708
Y148	<i>Iris urminensis</i> Hoog	6505
Y138	<i>Iris xanthosporia</i> B. Mathew & T. Baytop *	4813

* Endemic taxa

2.2. Preparation of extracts

The washed with tap water, dried and powdered rhizomes (2 g) were extracted by maceration with dichloromethane at room temperature and concentrated under vacuum. Then residues were extracted by maceration with methanol and dried by rotary evaporator.

2.3. Cholinesterase inhibition assays

Extracts were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory activity at 200 µg/ml using ELISA microplate reader. AChE and BChE inhibitory activity was measured by slightly modified spectrophotometric method of Ellman et al. (Ellman et al. 1961). Electric eel AChE (Type-VI-S; EC 3.1.1.7, Sigma, St. Louis, MO, USA) and horse serum BChE (EC 3.1.1.8, Sigma, St. Louis, MO, USA) were the enzyme sources used, while acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed as the substrates of the reaction. 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic)acid (DTNB; Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for the measurement of the anticholinesterase activity. All reagents and conditions were same as described in our previous publication (Sevim et al. 2013). Galanthamine (Sigma, St. Louis, MO, USA), the anticholinesterase alkaloid-type of drug obtained from the bulbs of *Galanthus* sp. was used as the reference. The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software (Sunnyvale, CA, USA). Experiments were run in triplicate and the results were expressed as average values with S.E.M.

2.4. Antioxidant capacity assay

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of the extracts was also tested at 2 mg/ml stock concentrations by ELISA microplate reader. It was measured by spectrophotometric method of Mardsen S. Blois which was modified by Hatano (Blois, 1958; Hatano, 1995). Gallic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) was employed as the reference. The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software (Sunnyvale, CA, USA). Experiments were run in triplicate and the results were expressed as average values with S.E.M.

3. Results

The *in vitro* antioxidant and anticholinesterase activities of dichloromethane and methanol extracts prepared from the rhizomes of 47 *Iris* species collected from Turkey have reported for the first time in this study. Anticholinesterase activities and antioxidant capacities by using DPPH radical scavenging activity of dichloromethane and methanol extracts of *Iris* species were given in Table 2 and 3.

Table 2. AChE and BChE Inhibition (Inhibition % \pm S.E.M.*) and DPPH Radical Scavenging Activity of (Scavenging activity % \pm S.E.M.) of The Dichloromethane Extracts of *Iris* Taxa

Codes of Extracts	AChE Inhibition (% \pm S.E.M.)	BChE Inhibition (% \pm S.E.M.)	DPPH Radical Scavenging Activity (% \pm S.E.M.)
	200 μ g/ml ^a	200 μ g/ml	2000 μ g/ml ^b
Y100D	- **	10.46 \pm 0.63	35.73 \pm 1.88
Y101D	-	3.41 \pm 1.05	29.35 \pm 3.12
Y102D	-	-	24.98 \pm 1.70
Y103D	-	-	30.72 \pm 0.61
Y104D	-	11.42 \pm 0.85	11.51 \pm 2.37
Y105D	-	7.76 \pm 0.16	27.79 \pm 0.93
Y106D	-	-	31.51 \pm 2.80
Y107D	-	11.65 \pm 0.26	23.99 \pm 0.66
Y108D	-	19.07 \pm 3.20	8.21 \pm 1.05
Y109D	-	15.05 \pm 4.60	30.32 \pm 1.88
Y110D	-	5.62 \pm 0.32	9.10 \pm 0.53
Y111D	7.81 \pm 1.95	8.40 \pm 0.19	19.56 \pm 1.98
Y112D	-	9.60 \pm 0.01	22.82 \pm 1.47
Y113D	-	5.80 \pm 0.74	15.05 \pm 1.08
Y114D	-	-	30.30 \pm 0.94
Y115D	-	-	22.38 \pm 0.78
Y116D	-	22.92 \pm 1.29	14.89 \pm 1.57
Y117D	-	17.07 \pm 5.43	8.92 \pm 0.87
Y118D	5.14 \pm 0.81	7.78 \pm 0.68	10.04 \pm 1.82
Y119D	11.74 \pm 1.33	-	15.96 \pm 2.33
Y120D	-	-	15.15 \pm 2.43
Y122D	6.42 \pm 1.89	-	25.52 \pm 0.96
Y123D	-	1.76 \pm 0.52	10.47 \pm 2.68
Y124D	-	4.47 \pm 0.73	52.09 \pm 2.46
Y126D	6.99 \pm 0.56	-	12.41 \pm 1.23
Y127D	-	1.94 \pm 0.73	29.28 \pm 2.20
Y128D	-	-	7.49 \pm 2.90
Y129D	-	-	10.94 \pm 3.79
Y130D	-	9.72 \pm 0.18	21.58 \pm 0.82
Y131D	-	5.18 \pm 0.18	30.36 \pm 1.62
Y132D	-	-	57.91 \pm 3.20
Y133D	-	10.34 \pm 1.08	12.69 \pm 1.23
Y134D	-	-	7.99 \pm 1.88
Y135D	-	1.34 \pm 0.55	11.41 \pm 2.99
Y136D	-	10.58 \pm 0.26	23.13 \pm 1.02
Y137D	11.22 \pm 0.99	6.18 \pm 0.08	22.22 \pm 0.63
Y138D	-	-	14.46 \pm 1.26
Y139D	-	-	4.76 \pm 1.10
Y140D	-	-	13.22 \pm 1.37
Y141D	-	14.51 \pm 1.74	24.15 \pm 1.86
Y142D	13.49 \pm 0.48	13.21 \pm 0.87	9.89 \pm 1.02
Y143D	8.41 \pm 3.32	40.44 \pm 0.12	63.46 \pm 2.25
Y144D	-	6.39 \pm 0.12	3.01 \pm 2.20
Y145D	-	3.95 \pm 2.16	11.71 \pm 0.89
Y146D	-	4.45 \pm 0.56	32.70 \pm 0.34
Y147D	-	3.25 \pm 2.26	7.87 \pm 0.41
Y148D	-	-	21.19 \pm 0.96
References			
G ¹	94.58 \pm 0.82	89.29 \pm 0.96	NT
GA ²	NT ***	NT	91.56 \pm 0.68

* Standard error mean (n=3), ** No activity, *** Not tested, a Final concentration, b Stock concentration, D: Dichloromethane, 1 Galanthamine (100 μ g/ml), 2 Gallic acid (2000 μ g/ml)

Table 3. AChE and BChE Inhibition (Inhibition % \pm S.E.M.*) and DPPH Radical Scavenging Activity of (Scavenging activity % \pm S.E.M.) of The Methanol Extracts of *Iris* Taxa

Codes of Extracts	AChE Inhibition (% \pm S.E.M.)	BChE Inhibition (% \pm S.E.M.)	DPPH Radical Scavenging Activity (% \pm S.E.M.)
	200 μ g/ml ^a	200 μ g/ml	2000 μ g/ml ^b
Y100M	- **	7.53 \pm 1.45	4.79 \pm 1.84
Y101M	-	10.84 \pm 1.06	7.51 \pm 0.96
Y102M	-	2.54 \pm 0.84	65.28 \pm 1.77
Y103M	-	14.07 \pm 2.20	12.57 \pm 0.68
Y104M	-	9.28 \pm 1.17	4.84 \pm 2.10
Y105M	-	15.96 \pm 2.68	8.55 \pm 2.37
Y106M	-	6.52 \pm 1.48	5.04 \pm 0.48
Y107M	-	15.36 \pm 1.61	40.26 \pm 0.70
Y108M	-	19.81 \pm 0.84	3.55 \pm 1.27
Y109M	-	-	39.50 \pm 2.69
Y110M	-	23.23 \pm 4.25	12.99 \pm 2.52
Y111M	-	37.63 \pm 0.02	9.26 \pm 0.66
Y112M	-	4.06 \pm 0.41	7.71 \pm 0.73
Y113M	-	17.02 \pm 2.82	55.49 \pm 1.34
Y114M	-	-	15.58 \pm 1.46
Y115M	-	16.64 \pm 3.74	21.90 \pm 1.44
Y116M	-	12.92 \pm 1.47	5.15 \pm 0.55
Y117M	-	4.19 \pm 0.58	2.42 \pm 0.66
Y118M	-	22.41 \pm 1.39	37.70 \pm 2.91
Y119M	-	12.22 \pm 2.63	42.33 \pm 2.89
Y120M	-	10.57 \pm 2.51	24.26 \pm 0.74
Y122M	40.40 \pm 3.30	80.22 \pm 1.04	91.33 \pm 0.05
Y123M	-	10.73 \pm 3.17	44.85 \pm 2.42
Y124M	-	15.37 \pm 4.09	90.42 \pm 0.40
Y126M	-	28.40 \pm 1.34	29.45 \pm 1.46
Y127M	-	2.98 \pm 1.49	44.68 \pm 1.36
Y128M	-	3.26 \pm 1.75	2.58 \pm 0.66
Y129M	-	7.12 \pm 1.62	7.25 \pm 1.16
Y130M	-	13.03 \pm 0.51	4.92 \pm 0.21
Y131M	9.89 \pm 0.52	53.06 \pm 1.13	91.61 \pm 0.58
Y132M	-	6.40 \pm 3.38	9.54 \pm 0.19
Y133M	-	22.00 \pm 2.20	12.44 \pm 1.27
Y134M	-	3.45 \pm 1.91	41.35 \pm 0.39
Y135M	-	-	8.20 \pm 0.22
Y136M	-	-	55.72 \pm 1.09
Y137M	-	-	84.31 \pm 0.63
Y138M	-	6.33 \pm 0.46	5.67 \pm 1.55
Y139M	-	11.13 \pm 1.47	12.28 \pm 1.07
Y140M	-	4.28 \pm 0.26	12.92 \pm 0.28
Y141M	-	1.93 \pm 0.10	11.98 \pm 0.47
Y142M	1.43 \pm 0.43	6.36 \pm 0.98	5.68 \pm 0.79
Y143M	22.56 \pm 1.86	5.86 \pm 2.71	64.02 \pm 14.37
Y144M	-	16.92 \pm 1.76	13.43 \pm 3.33
Y145M	-	5.13 \pm 0.49	16.69 \pm 1.99
Y146M	-	2.34 \pm 1.16	14.65 \pm 1.73
Y147M	-	8.06 \pm 0.93	9.90 \pm 0.06
Y148M	-	4.72 \pm 2.22	52.05 \pm 1.90
References			
G ¹	94.58 \pm 0.82	89.29 \pm 0.96	NT
GA ²	NT ***	NT	91.56 \pm 0.68

* Standard error mean (n=3), ** No activity, *** Not tested, a Final concentration, b Stock concentration, M: Methanol, 1 Galanthamine (100 μ g/ml), 2 Gallic acid (2000 μ g/ml)

4. Discussion

Oxidative stress is known to play an important role in pathogenesis of several diseases such as diabetes mellitus and neurodegenerative disorders (Howes ve ark. 2003; Sevim, 2018). On the other hand, one of the hypothesis that has been proposed to restrain the cholinergic function is the inhibition of AChE and BChE for the elevation of acetylcholine level for treatment of AD. Depends on side effects of available drugs used for AD have resulted in continuing our researches to determine AChE inhibitors from geophytes.

During this extensive study, the extracts of 47 *Iris* taxa have been screened for their antioxidant and anticholinesterase effects due to their rich phenolic compounds. From these species, *Iris kerneriana* and *I. pseudacorus* have been found the highest BChE inhibitory effects. In the previous researches on the anticholinesterase activity of *I. suaveolens*, *I. albicans* and *I. schachtii* were also shown low activity against AChE and BChE (Hacıbekiroğlu ve Kolak, 2011; 2015; Mocan et al. 2018). In regarding radical scavenging effect of *Iris kerneriana*, *I. lazica*, *I. pseudacorus* and *I. suaveolens* have been determined above 90 % as similar standard compound used as gallic acid. These results indicated that the highest antioxidant activity was exhibited for methanolic extracts contained polar compounds.

5. Conclusions

Iris species are cultivated on a commercial scale as ornamental plants. In this study, the dichloromethane and methanol extracts prepared from the rhizomes of 47 *Iris* taxa growing in Turkey were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory effects against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) which the enzymes linked to Alzheimer's diseases and also antioxidant capacities using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test. The samples have been found more active against BChE than AChE. Compared with 100 µg/ml galanthamine (89.29 ± 0.96 %) as reference, *Iris kerneriana* (coded as Y122) and *Iris pseudacorus* (coded as Y131) methanol extracts had significant BChE inhibition effect (respectively, 80.22 ± 1.04 % and 53.06 ± 1.13 %) at concentration of 200 µg/ml (Table 3). In addition, methanol extracts of *I. kerneriana*, *I. lazica*, *I. pseudacorus* and *I. suaveolens* have shown remarkable antioxidant activity at concentration of 2 mg/ml for DPPH compared with gallic acid (Table 3.). Therefore, the aforementioned *Iris* species have been deserved further searches for their high BChE inhibition and antioxidant potential.

Acknowledgements

Turkish Scientific and Technological Research Council (TÜBİTAK) for financial source (Project code: KAMAG-110G007) was kindly acknowledged.

References

Atta-ur-Rahman, Nasim S, Baig I, Jahan IA, Sener B, Orhan I, Choudhary MI 2002. Isoflavonoid glycosides from the

rhizomes of *Iris germanica*, Chem Pharm Bull 50(8):1100-1102.

Atta-ur-Rahman, Nasim S, Baig I, Orhan I, Sener B, Ayanoglu F, Choudhary MI 2003. Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica*. Helv Chim Acta. 86: 3354-3362.

Atta-ur-Rahman, Nasim S, Baig I, Sener B, Orhan I, Ayanoglu F, Choudhary MI 2004. Two new isoflavonoids from the rhizomes of *Iris soforana*, Nat Prod Res. 18(5): 465-471.

Blois MS 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181: 1119-1200.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 7(2): 88-95.

Güner A, 2012. *Iris* L. In: Güner A, Aslan S, Vural M, Babaş MT (Eds.), Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanic Garden and Floristic Research Society, pp. 535-540.

Hacıbekiroğlu I, Kolak U 2011. Antioxidant and anticholinesterase constituents from the petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*. Phytoter Res. 25: 522-529.

Hacıbekiroğlu I, Kolak U 2015. Screening antioxidant and anticholinesterase potential of *Iris albicans* extracts. Arab J Chem. 8: 264-268.

Hatano T 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species – Tannins and related polyphenols. Nat Med. 49(4): 357-363.

Howes MJR, Houghton PJ, Perry NSL 2003. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. Phytoter Res. 17: 1-18.

Kaya E 2014. Geophytes of Turkey. Yalova: Atatürk Central Horticultural Research Institute, pp. 1-96.

Mocan A, Zengin G, Mollica A, Uysal A, Gunes E, Crisan G, Aktumsek A 2018. Biological effects and chemical characterization of *Iris schachtii* Markgr. extracts - A new source of bioactive constituents. Food Chem Toxicol. 112: 448-457.

Orhan I, Şener B, Hashimoto T, Asakawa Y, Özgüven M, Ayanoglu F 2002. Iristectorone K, a novel monocyclic triterpene ester from *Iris germanica* rhizomes growing in Turkey. Fitoterapia. 73: 316-319.

Orhan I, Nasim S, Şener B, Ayanoglu F, Özgüven M, Choudhary MI, Atta-ur-Rahman 2003. Two isoflavones and bioactivity spectrum of the crude extracts of *Iris germanica* rhizomes. Phytoter Res. 17: 575-577.

Sevim D, Senol FS, Gulpinar AR, Erdogan Orhan I, Kaya E, Kartal M, Sener B 2013. Discovery of potent *in vitro* neuroprotective effect of the seed extracts from seven *Paeonia* L. (peony) taxa and their fatty acid composition. Ind Crops Prod. 49: 240-246.

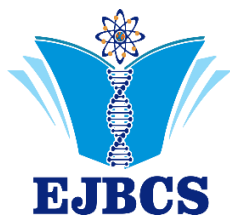
Sevim D 2018. Pharmacognosic studies on some *Iris* L. species. Ph. D. Thesis, Ankara: Gazi University Institute of Health Sciences, pp. 1-219.

Singab ANB, Ayoub IM, El-Shazly M, Korinek M, Wu T, Cheng Y, Chang F, Wu Y 2016. Shedding the light on Iridaceae - Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. Ind Crops Prod. 92: 308-335.

Ullah F, Ayaz M, Sadiq A, Hussain A, Ahmad S, Imran M, Zeb A 2016. Phenolic, flavonoid contents, anticholinesterase and

antioxidant evaluation of *Iris germanica* var. *florentina*. Nat
Prod Res, 30(12): 1440-1444.

Wang H, Cui Y, Zhao C 2010. Flavonoids of the genus *Iris*
(Iridaceae). Mini-Rev Med Chem. 10: 643-661.



Isolation and Identification of Cholinesterase Inhibitors from the Bulbs of *Iris pseudacorus* L.

Duygu Sevim^{1*} , Bilge Şener¹ 

¹Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Ankara, Turkey

*Corresponding author : duygusvm@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-3987-2466>

Received : 06/08/2019
Accepted : 02/02/2020

Abstract: Most of the bulbous plants are known for their medicinal purposes in addition to their ornamental value. Turkey is one of the home country of many beautiful bulbous plants. In continuation of our extensive studies on finding new natural cholinesterase inhibitors from Turkish medicinal plants, *Iris* L. species were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory effects designed to assess cholinesterase inhibitor activities on both acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) and antioxidant capacities with respect to their neuroprotective potential in this study.

The dichloromethane and methanol extracts prepared from the bulbs of 47 *Iris* taxa were screened by using modified Ellmann method and the highest butyrylcholinesterase inhibitory effect was found in the methanol extract of the bulbs of *Iris pseudacorus* L. (Sevim, 2018). The dichloromethane sub-extract, which is obtained bioactivity-guided fractionation of methanol extract of *I. pseudacorus* L., was exhibited significant butyrylcholinesterase inhibitory activity (73.65 ± 2.06 %). These active sub-extract was subjected to fractionation on column chromatography and obtained six fractions. Among the fractions, coded as N5 was shown the significant butyrylcholinesterase inhibitory activity (93.78 ± 1.49 %) compared with galanthamine (80.02 ± 0.12 %). Fractionation of N5 on flash chromatography the highest butyrylcholinesterase inhibitory activity of sub-fraction coded as DS-5 was determined as 94.00 ± 1.03 %. The responsible compound from the activity of this sub-fraction was detected as irisolidone glucopyranoside based on its mass data by using LC-ESI-Q/TOF-MS-MS technique.

Keywords: *Iris pseudacorus* L., Iridaceae, Activity, Anticholinesterase

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Iris* L. (Iridaceae) is a member of geophytes with attractive flowers. There are about 56 *Iris* taxa growing in Turkey, 24 of which are endemic (Güner, 2012). *Iris* species are an important plants as an ornamental due to their different colours and attractive flowers (Orhan et al., 2002, Atta-ur-Rahman et al., 2004, Wang et al., 2010); they have also evaluated in the preparation of products as an violet odour from their rhizomes in perfumery and cosmetic industries (Atta-ur-Rahman et al., 2004). Besides, *Iris* species were reported to be utilized for the treatment of different ailments in traditional medicine as an anticholinesterase, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, antiinflammatory, hepatoprotective, molluscicidal and cytotoxic effects depends on variety of secondary metabolites (Wang et al., 2010, Singab et al., 2016). Alzheimer's disease (AD) is one of the neurodegenerative disorder affecting the elder people (Howes et al., 2003). One of the main approaches has been for the control of AD is the

inhibition of acetylcholinesterase and butrylcholinesterase for the elevation of acetylcholine level secreted from synaptic region in brain to restrain the cholinergic function related with memory loss. Currently, clinically available drugs are used for the treatment of AD. Continuing our researches in the field of anticholinesterase activity, we herein aimed to determine butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Iris pseudacorus* L. showed the highest inhibitory activity *Iris* L. species (Sevim, 2018).

2. Materials and Method

2.1. Plant material

The rhizomes of *Iris pseudacorus* L. were collected from Hatay province and identified by Prof. Dr. Neriman Ozhatay and Prof. Dr. Adil Güner and preserved as *ex-situ* at Atatürk Horticultural Central Research Institute, Department of Ornamental Plant Breeding and Agronomy in Yalova, Turkey (population no. 3108) (Mathew, 1984, Güner, 2012).

2.2. Preparation of extracts

The washed with tap water, dried and powdered rhizomes (350 g) were extracted with methanol at room temperature by maceration. The combined methanolic extracts were evaporated *in vacuo* and obtained as 87.75 g extract (D18RM).

2.3. Cholinesterase inhibition assays

Extracts were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory activity at 200 µg/mL using ELISA microplate reader. AChE and BChE inhibitory activity was measured by slightly modified spectrophotometric method of Ellman et al. (Ellman et al., 1961). Electric eel AChE (Type-VI-S; EC 3.1.1.7, Sigma, St. Louis, MO, USA) and horse serum BChE (EC 3.1.1.8, Sigma, St. Louis, MO, USA) were the enzyme sources used, while acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed as the substrates of the reaction. 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic)acid (DTNB; Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for the measurement of the anticholinesterase activity. All reagents and conditions were same as described in our previous publication (Sevim et al., 2013). Galanthamine (Sigma, St. Louis, MO, USA), the anticholinesterase alkaloid-type of drug obtained from the bulbs of *Galanthus* sp., was used as the reference. The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software (Sunnyvale, CA, USA). Experiments were run in triplicate and the results were expressed as average values with S.E.M.

2.4. Bioactivity-guided fractionation

The dried methanolic extract (85 g) was diluted with distilled water-methanol mixture (50:450) and extracted with hexane (D18RM-H). After hexane extraction, the residue has extracted with dichloromethane (D18RM-D), ethylacetate (D18RM-E), *n*-butanol (D18RM-B) and water (D18RM-W).

2.5. Column chromatography

The active dichloromethane extract (D18RM-D) was subjected on column chromatography using silica gel 60 (63-200 µm, Merck) and dichloromethane-methanol to obtain six main fractions (N1-N6). Among them, sub-fraction (N5) was applied on flash chromatography (Combi flash EZ prep) on normal phase silica gel (Silica 12 g gold) collected five sub-fractions (DS-1-DS-5).

2.6. LC-ESI-Q/TOF-MS-MS analysis

The LC-UV equipment used was an Agilent 1260 system with vacuum degasser, binary pump, autosampler, thermostated column compartment and ultraviolet detector (Agilent Corporation, Palo Alto, CA, USA). The chromatographic separation was performed at 40°C on an Agilent Poroshell 120 SB-C18 column (4,6 mm x 150 mm

x 2,7 µm) with a flow rate of 0.6 mL/min and the injection volume was 5 µL. The mobile phase consisted of 0.1 % formic acid (A) and acetonitrile (B), the gradient program was optimized as follows: 0-2 min, 5% B; 2-5 min, 20% B; 5-15 min, 50% B; 15-17 min, 50% B; 17-22 min 95% B; 22-26 min, 95% B, 26-32 min, 5% B. Samples were detected at 254 nm.

LC-ESI-Q/TOF-MS-MS analyses was performed by an Agilent series 1260 Infinity instrument coupled with an Agilent 6550 iFunnel Q/TOF mass spectrometer (Agilent Corporation, Palo Alto, CA, USA) equipped with an ESI ion source as interface. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid-water and acetonitrile was used. The gradient program and detection wavelength were the same with LC-UV detection system. The mass spectra were acquired across the range of *m/z* 100-1000 (for MS) and *m/z* 50-500 (for MS-MS) in positive mode. The operating parameters of mass spectrometer were as follows: drying gas flow rate 14 L/min; drying gas temperature, 290°C, nebulizer, 40 psi; capillary voltage, 3500 V; fragment voltage, 400 V; skimmer voltage, 65 V and Oct RFV, 750 V. The collision energy was set at 10, 20 and 40 V. All MS data were controlled by MassHunter software B.06.01 (Data Acquisition) and B.07.00 (Qualitative Analysis).

3. Results

3.1. Cholinesterase inhibition results

Although none of the extracts, sub-extracts and fractions had significant activity against AChE, methanol extract (D18RM) had shown moderate BChE inhibitory activity (53.06 ± 1.13 % at 200 µg/mL) against the standard alkaloid galanthamine. The BChE inhibitions of the sub-extracts obtained from methanolic extract by using liquid-liquid chromatography were given in Table 1.

Table 1. BChE inhibitory effects of the sub-extracts of *Iris pseudacorus*

Sub-extracts	Codes	BChE Inhibition (Inhibition % ± S.D*) 200 µg/mL
<i>n</i> -Hexane	D18RM-H	23.48 ± 1.97
Dichloromethane	D18RM-D	73.65 ± 2.06
Ethylacetate	D18RM-E	49.78 ± 2.85
<i>n</i> -Butanol	D18RM-B	19.71 ± 0.54
Water	D18RM-W	41.26 ± 2.67
Galanthamine		80.02 ± 0.12

* Values are expressed as mean ± S.D are three parallel assays

The highest BChE inhibitory activity had determined in dichloromethane sub-extract. Therefore, this sub-fraction (D18RM-D) was subjected to column chromatography to obtain 120 fractions, after the combination of similar fractions, 6 main fractions coded as N1-N6 were collected (Table 2).

Table 2. The main fractions of the dichloromethane (D18RM-D) sub-extract *Iris pseudacorus*

Solvent systems	Fractions
Dichloromethane (% 100)	(N1) Fractions 1-5
Dichloromethane : Methanol (99:1)	(N2) Fractions 6-20
Dichloromethane : Methanol (90:10)	(N3) Fractions 21-50
Dichloromethane : Methanol (85:15)	(N4) Fractions 51-58
Dichloromethane : Methanol (80:20)	(N5) Fractions 59-73
Dichloromethane : Methanol (60:40)	(N6) Fractions 74-120
Methanol (% 100)	

The BChE inhibitory activities of these main fractions were presented in Table 3.

Table 3. BChE inhibitory effects of the sub-extracts of *Iris pseudacorus*

Fractions	BChE Inhibition (Inhibition % ± S.D*) 200 µg/mL
D18RM (Methanol extract)	53.06 ± 1.13
D18RM-D (Dichloromethane sub-extract)	73.65 ± 2.06
N1	10.35 ± 0.01
N2	67.66 ± 0.48
N3	52.26 ± 2.64
N4	56.84 ± 1.52
N5	93.78 ± 1.49
N6	77.15 ± 3.12
Galanthamine	80.02 ± 0.12

* Values are expressed as mean ± S.D are three parallel assays

The main fraction coded as N-5 exerted the highest BChE inhibition (93.78 ± 1.49) which was comparable to that of the standard (galanthamine). After the fractionation of N-5 by using flash chromatography, five sub-fractions (DS-1, DS-2, DS-3, DS-4 and DS-5) were isolated and the sub-fraction DS-5 was shown the highest BChE inhibition (94.00 ± 1.03) which had a closer value to that of the main fraction N-5. The BChE inhibitory activities of these fractions alongwith the sub-fractions were given in Table 4.

Table 4. BChE inhibitory effects of the sub-fractions isolated from the main fraction of N-5

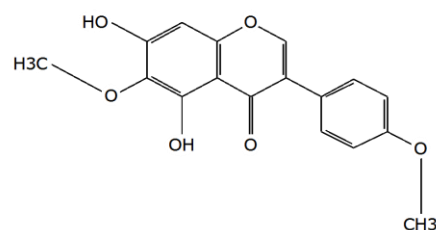
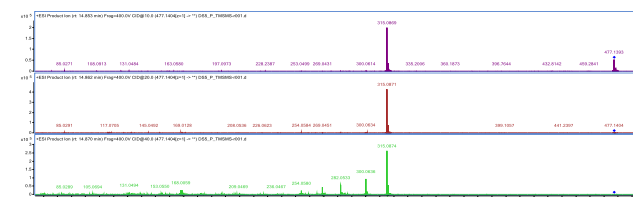
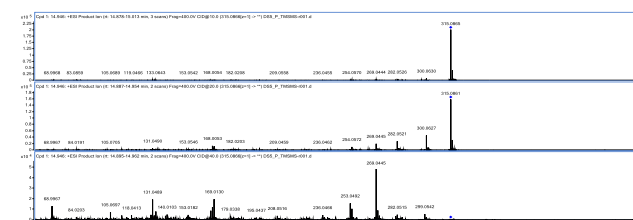
Extract, sub-extract, main fraction and sub-fractions	BChE Inhibition (Inhibition % ± S.D*) 200 µg/mL
DS-1	20.87 ± 1.95
DS-2	19.29 ± 3.39
DS-3	22.47 ± 3.40
DS-4	20.85 ± 4.91
DS-5	94.00 ± 1.03
Galanthamine	80.02 ± 0.12

* Values are expressed as mean ± S.D are three parallel assays

4. Discussion

The responsible BChE inhibitory active compound of *Iris pseudacorus* L., which obtained from sub-fraction coded as DS-5, was analyzed by liquid chromatography-electron spray ionization-quadrupole/time-of-flight-mass spectrometry-mass spectrometry (LC-ESI-Q/TOF-MS-MS) and molecular ions at [M+1]⁺ 477 and [M+1]⁺ 315 were indicated (Spectrum 1 and 2). According to mass

fragmentation pattern of [M+1]⁺ 315; 300, 282 and 269 ions were obtained and the comparison of the data given in literature (Schütz et al., 2011, Xie et al., 2014, Bhat et al., 2014), this ion was determined as 'Irisolidone' (Fig. 1). On the other hand, the mass fragmentation pattern of [M+1]⁺ 477 were given 315 and 163 ions belonged to irisolidone and glucose. These findings were also confirmed with the data given in previous studies (Schütz et al., 2011, Xie et al., 2014, Bhat et al., 2014) and established as "Irisolidone glucopyranoside".

**Figure 1.** Irisolidone**Spectrum 1.** Mass fragmentation of [M+1]⁺ 477 (irisolidone glucopyranoside)**Spectrum 2.** Mass fragmentation of [M+1]⁺ 315 (irisolidone)

5. Conclusions

Discoveries of lead compounds for the development of new drug candidates from bioresources can help to promote incentives for conservation by providing an economic return to innovative use of those sources. Screening of natural sources has had an impressive tool of determining active agents. The key to successfully discovering therapeutic agents from bioresources is based on bioassay-directed isolation techniques. HTS tests and mechanism-based screening protocols as well as information of folkloric utilization of plants have led to the discovery of lead compounds as drug candidates.

In this study, *Iris* L. species belonged to ornamental geophytes growing in Turkey were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory effects and antioxidant capacities. The dichloromethane and methanol extracts prepared from the bulbs of 47 *Iris* species were screened by using modified Ellmann method and the highest butyrylcholinesterase inhibitory effect was found in the dichloromethane extract of the bulbs of *I. pseudacorus* L.

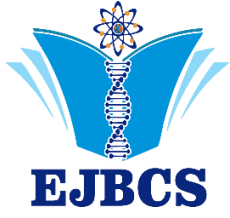
(Sevim, 2018). According to bioassay-guided fractionation procedure, the active dichloromethane extract was subjected to fractionation on column and flash chromatographies and the activities of the fractions were tested. The determined active fraction was analyzed by using LC-ESI-Q/TOF-MS-MS technique. The responsible compound from the activity of this fraction was detected as irisolidone glucopyranoside as an isoflavonoid derivatives based on their mass data by comparison with the mass fragmentation pattern of irisolidon glucopyranoside given in the literature (Schütz, 2011). Further studies should be performed to determine *in vivo* studies.

Acknowledgements

Turkish Scientific and Technological Research Council (TÜBİTAK) for financial source (Project code: KAMAG-110G007) was kindly acknowledged.

References

- Atta-ur-Rahman, Nasim S, Baig I, Sener B, Orhan I, Ayanoğlu F, Choudhary MI 2004. Two new isoflavonoids from the rhizomes of *Iris soforana*. *Nat Prod Res.* 18(5): 465-471.
- Bhat G, Shawl AS, Shah Z, Tantry M 2014. HPLC-DAD-ESI-MS/MS Identification and characterization of major constituents of *Iris crocea*, *Iris germanica* and *Iris spuria* L. growing in Kashmir Himalayas, India. *J Anal Bioanal Techniques.* 5(6), 1-10.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(2): 88-95.
- Güner A, 2012. *Iris* L. In: Güner A, Aslan S, Vural M, Babaş MT (Eds.), *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanic Garden and Floristic Research Society, pp. 535-540.
- Howes MJR, Houghton PJ, Perry NSL 2003. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother Res* 17: 1-18.
- Mathew B 1984. *Iris* L. In: Davis P.H. (Ed.), *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Vol. VIII. Edinburgh: University Press, pp. 381-396.
- Orhan I, Nasim S, Şener B, Ayanoğlu F, Özgüven M, Choudhary MI, Atta-ur-Rahman 2003. Two isoflavones and bioactivity spectrum of the crude extracts of *Iris germanica* rhizomes. *Phytother Res* 17: 575-577.
- Schütz C, Quitschau M, Hamburger M, Potterat O 2011. Profiling of isoflavonoids in *Iris germanica* rhizome extracts by microprobe NMR and HPLC-PDA-MS analysis. *Fitoterapia* 82: 1021-1026.
- Sevim D, Senol FS, Gulpinar AR, Erdogan Orhan I, Kaya E, Kartal M, Sener B 2013. Discovery of potent *in vitro* neuroprotective effect of the seed extracts from seven *Paeonia* L. (peony) taxa and their fatty acid composition. *Ind Crops Prod* 49: 240-246.
- Sevim D 2018. *Pharmacognosic Researches on Iris L. Species Growing in Turkey*, Ph.D. Thesis, Gazi University, Institute of Health Sciences: Ankara.
- Singab ANB, Ayoub IM, El-Shazyl M, Korinek M, Wu T, Cheng Y, Chang F, Wu Y 2016. Shedding the light on Iridaceae - Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. *Ind Crops Prod* 92: 308-335.
- Şener B, Orhan İ 2003. Alzheimer hastalığının tedavisinde geliştirilen bileşikler. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, 16(1): 3-8.
- Xie G, Zhu Y, Shu P, Qin X, Wu G, Wang Q, Qin M 2014. Phenolic metabolite profiles and antioxidants assay of three Iridaceae medicinal plants for traditional Chinese medicine 'She-gan' by on-line HPLC-DAD coupled with chemiluminescence (CL) and ESI-Q-TOF-MS/MS. *J Pharmaceut Biomed* 98: 40-51.
- Wang H, Cui Y, Zhao C 2010. Flavonoids of the genus *Iris* (Iridaceae). *Mini-Rev Med Chem* 10: 643-661.



Optimization of a chromatographic method for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples

Selman Kander^{1*} , Belgin İzgi¹ 

¹Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bursa, Türkiye

*Corresponding author : skander@buski.gov.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-2098-9445>

Received : 02/09/2019
Accepted : 12/04/2020

Abstract: Negative effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are identified by various studies. Pre-processing methods to improve analysis and pre-analysis concentration of PAHs have great importance, especially for drinking water. In this study, in drinking water, EPA 550.1 method used for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water is aimed studied to reduce the amount and time by performing the amount of chemical and analysis time. According to recovery and repeatability parameters, results are obtained after the modification is compared with values in original EPA method 550.1. Using a total of 70 ml chemical with modified method for six PAH parameters, the percentage recovery results are as follows; flour anthems %99,5, Benzo(b)flouranthene %90,5, Benzo(k)flouranthene %84,8, Benzo(a)pyrene %91,1, Benzo (g,h,i) perylene 75,9 and Indeno(1,2,3-c,d)pyrene % 79,1. Furthermore another basis of the Solid phase extraction (SPE) method, relative standard deviation of the percentage results for the same 6 PAH parameter are as follows; flouranthene % 12,8, Benzo(b)flouranthene % 8,4, Benzo(k)flouranthene %8,5, Benzo(a)pyrene % 8,02, Benzo(g,h,i)perylene % 12,2 and Indeno(1,2,3-c,d)pyrene % 17,5. In the modified innovative methods, recovery and repeatability results are observed to be analytically compatible to the values of the method EPA 550.1

Keywords: PAH,SPE,UHPLC, Drinking Water

İçme suyu örneklerinde polisiklik aromatik hidrokarbonlar miktarının belirlenmesi için bir kromatografik yöntemin optimizasyonu

Özet: Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir. PAH'ların özellikle içme suyundaki analiz ve analiz öncesi derişim arttırmaya yönelik uygulanan ön işlem metotları büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada içme suyunda PAH'ların analizi için kullanılan EPA 550.1 metodunda harcanan kimyasal ve analiz süresi miktarı üzerinden çalışma yapılarak miktar ve süre azaltılması hedeflenmiştir. Geri kazanım ve tekrarlanabilirlik parametrelerine göre değerlendirmelerle elde edilen sonuçlar EPA 550.1 metodundaki değerlerle karşılaştırılmıştır. Toplam 70 mL kimyasal kullanarak modifiye edilen metotla altı PAH parametresi için yüzdesel geri kazanım değerleri; Floranten %99,5, Benzo(b)floranten %90,5, Benzo(k)floranten, %84,8, Benzo(a)piren %91,1, Benzo(g,h,i)perilen %75,9 ve İndeno(1,2,3-c,d)piren %79,1 olarak hesaplanmıştır. Aynı altı PAH parametresi için SPE metodundan hesaplanan tekrarlanabilirlik için yüzde bağıl standart sapma sonuçları; Floranten %12,8, Benzo(b)floranten %8,4, Benzo(k)floranten, %8,5, Benzo(a)piren %8,0, Benzo(g,h,i)perilen %12,2 ve İndeno(1,2,3-c,d)piren %17,5'dir. Modifiye edilen inovasyon metodunda geri kazanım ve tekrarlanabilirlik sonuçlarının da EPA 550.1 metodunda verilen değerlerle analitik açıdan uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler:: PAH,SPE,UHPLC,İçme suyu

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

İnsan aktiviteleri sonucu yüksek miktarda organik kirletici çevreye bırakılmaktadır. polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) bu organik kirletici sınıflarından biridir ve çevrede yaygın olarak bulunurlar. PAH'lar canlı dokularında, sedimentlerde, toprakta, havada ve çeşitli su

kaynaklarında rastlamak mümkündür. PAH'ların kirlilik kaynağı sabit ve hareketli olmak üzere iki şekildedir. Sabit kaynaklar; evsel ısınma, üretim prosesleri, güç ve ısı üretimi, orman ve tarımsal yangınlar oluştur. Hareketli kaynakları ise motorlu taşıtların egzoz gazları oluşturmaktadır. Bu kirlilik kaynağı ortaya çıkan PAH,

partikülleri atmosferik çökeltme ve yüzey akışı gibi etkilerle su ortamına girebilmektedirler(Kurnaz ve Büyükgüngör, 2007). Atmosfere salınan PAH'lar uzun veya kısa mesafe taşınımıyla kaynaklarından çok uzaklara taşınabilirler yine kuru ve yağ çökeltme olaylarıyla tüm çevre bileşenlerine buradan da besin zincirine girerek insanların bünyelerine geçebilirler (ATSDR, 1995, Walker, 2001). 1976 yılında 30'dan fazla PAH ve türevlerinin kanserojenik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Günümüzde PAH'lar kanserojen etkiye sahip organik kirleticiler içerisinde en geniş sınıfı olarak bilinmektedir (Yalaki 2005; Gülçiçek 2011). Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) 16 PAH türünü temel kirletici olarak belirlemiştir. Bunlar; naftalen (Naph), asenaften (Ace), asenaften (Acy), floren (Flr), fenantren (Phe), antrasen (Ant), floranten (Flt), piren (Pyr), krisen (Chr), benzo(a)antrasen (BaA), benzo(b)floranten (BbF), benzo(k)floranten (BkF), benzo(a)piren (BaP), indeno(1,2,3-c,d)piren (IP), benzo(g,h,i)perilen (BghiPe) ve dibenzo(a,h)antrasen (DBaH) 'dir(Mastral ve ark. 2003). Yukarıda bahsi geçen bu PAH bileşikleri ve bunların metabolitleri hücre bölünmesini kontrol eden mekanizmalar üzerinde onarılamaz hasarlara yol açarak balık ve memelilerde tümör oluşumuna, dolayısıyla kansere yol açmaktadırlar (Gaga, 2004).

Çevresel numuneler eser düzeyde PAH içerirler. Bu yüzden PAH'ların çevresel matrislerde analizleri için genellikle bir ya da iki saflaştırma adımını içeren ekstraksiyon gibi numune ön işlemleri ile birleşik analiz teknikleri uygulanmaktadır(GC, 2004). Örnek saflaştırma ve deriştirme işlemleri modern analitik analiz yöntemleri içerisinde numune hazırlama basamağında önemli bir rol oynar. Numuneye uygulanan bu ön hazırlık işleminin amacı, analizi yapılmak istenilen analitleri matrisden ayırarak özütlemektir. Bu sayede analizin seçiciliğini, tayin edilebilirliğini, güvenilirliğini, doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini arttırmış olacaktır. (Büyüktuncel, 2012). Saflaştırılmış ya da zenginleştirilmiş PAH ekstraktlarının analizleri kromatografik tekniklerle gerçekleştirilir. En çok kullanılan teknikler gaz ve sıvı kromatografisidir. Her iki tekniğin de pahalı olması ve yetişmiş personel gerektirmesi gibi zorlukları bulunmaktadır (Pozzoli ve ark., 2004). Sıvı kromatografisinin gaz kromatografisine göre avantajı analizde kullanılan floresan dedektördür. Belirli bir dalga boyunda farklı PAH'ların farklı absorptivitesi ya da farklı PAH'ların farklı floresan spektrumlu karakteristiği bulunmaktadır. Bu sayede dedektörler maksimum cevap alınması açısından optimize edilebilir ve daha düşük limitlerde PAH analizi gerçekleştirilebilir (Hanedar, 2009).

Uluslararası standartlara bakıldığında yukarıda bahsedilen birleşik tekniklerin kullanıldığı iki analiz metodu göze çarpmaktadır. Bunlar ISO 17993 ve EPA 550.1 standartlarıdır. ISO standartında sıvı-sıvı ekstraksiyon yönetimi ile sıvı kromatografisini birlikte kullanırken EPA standartında katı faz ekstraksiyon yönetimi ile yine sıvı kromatografisi beraber kullanılmıştır (ISO, 2002, EPA, 1990). PAH analizleri için kullanılan standart analiz metodlarının yüksek kimyasal kullanımı ve uzun analiz sürelerine sahip olduğu gözlenmektedir. Bu çalışmada

Uluslararası bir standart olan EPA 550.1 analiz metodunun ilgililenen PAH'lar için daha yüksek verim ve daha düşük kimyasal kullanımı süresiyle tespit edilmesi için iyileştirilerek geliştirilmesi ve modifiye edilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Uygun SPE kolonu ve HPLC analiz adımları kullanılarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından içme sularında belirlenmiş olan floranten (Flt), benzo(b)floranten (BbF), benzo(k)floranten (BkF), benzo(a)piren (BaP), indeno(1,2,3-c,d)piren (IP), benzo(g,h,i)perilen (BghiPe) PAH türleri için standart ilaveli (spike) örnekler ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. PAH'ların katı faz ekstraksiyonu (SPE) C18 kolon (6.0 mL, 1000 mg) ile gerçekleştirilmiştir. C18 kolonlar 10'ar ml metanol ve ultra saf ile şartlandırılmıştır. Şekil 1'de analiz basamaklarının detaylı şekli verilmiştir.

Step	Flow	Vol-Time	M1-M8	Sample#	Cleanup Description
1	0.0000	0.0500	<input type="checkbox"/> Disp <input checked="" type="checkbox"/> Time	0	Reset
1	0.00000	0.05000	00000000	0	Reset
2	10.0000	10.0000	01611060	0	Hatti MeOH ile yıka
3	4.00000	10.0000	01111060	0	MeOH ile krt. sartla
4	5.00000	15.0000	02111060	0	R.Su ile krt. sartla
5	0.00000	0.05000	10112000	0	Numune yolunu ac
6	0.00000	32.5000	10112100	0	Numuneyi yükle
7	0.00000	0.80000	00622000	0	Vakumu kapat
8	0.00000	0.10000	00601060	0	Basinci düzenle
9	0.00000	0.05000	00000000	0	Stop
10	0.00000	0.35000	00000201	0	Num. Kab. Su ile yıka
11	0.00000	0.10000	00000001	0	Stop
12	0.00000	0.05000	10112000	0	Numune yolunu ac
13	0.00000	3.00000	10112100	0	Yıkama suyunu yükle
14	0.00000	0.80000	00622000	0	Vakumu kapat
15	0.00000	0.10000	00601060	0	Basinci düzenle
16	0.00000	0.05000	00000000	0	Stop
17	0.00000	6.50000	00121060	0	Azot ile kurutma
18	0.00000	0.05000	00102000	0	Azotu kapat
19	0.00000	0.10000	00601060	0	Basinci düzenle
20	0.00000	0.05000	00000000	0	Stop
21	10.0000	10.0000	04611060	0	Hatti DCM ile yıka
22	3.00000	6.00000	04111010	0	DCM ile elüte et
23	7.00000	7.00000	04111010	0	DCM ile elüte et
24	0.00000	0.05000	00000000	0	Stop
25	0.00000	1.00000	00121010	0	Azot ile hat. temizle
26	0.00000	0.01000	00101010	0	Basinci düzenle
27	0.00000	0.00000	00000000	0	Son

Şekil 1. Ekstraksiyon analiz basamakları

Spike örnekler 1 mL/dak akış hızında 13 mL diklorometan ile elüt edilmiştir. 13 ml konsantre edilmiş numune 35°C'de inert gaz akışında tam kurutmaya tabi tutulmuş ve 2.0 mL asetonitril içerisinde çözülmüştür. Şekilde 2'de detaylı HPLC koşulları verilmiştir.

SPE analizör: FMS PLE online SPE

HPLC Kolon: Brownlee Analitik PAH kolon (150 x 4,6 mm x 3,2 mm)

Mobil Fazlar: A. Su (% 10) B. Asetonitril (% 90)

Çalışma türü: İzokratik

Akış Hızı: 1 mL / dak

Enjeksiyon hacmi: 20 µL

Elapsed Time (min)	Excitation Wavelength (nm)	Emission Wavelength (nm)	Sensitivity	Baseline Mode
10.0	270	450	Super Low	Autzero
1.4	270	450	High	Autzero
1.8	260	420	Super Low	Autzero
3.8	260	420	Medium	Autzero
6.0	230	415	Low	Autzero
7.8	230	415	Medium	Autzero
8.2	260	480	Super Hig	Autzero
10.0	260	480	Super Hig	Autzero

Şekil 2. HPLC analiz koşulları

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Kör (Blank) Numune Analiz Sonuçları

Öncelikli olarak geri kazanım çalışmalarında kullanılacak olan spike örneklerinde ultra saf sudan kaynaklı PAH kirliliği tespitine yönelik kör numune analizi yapılmıştır. Beş adet kör numune ile çalışılmıştır. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak, derişim faktörü olan 500'e bölünmesi ile sonuçlar matematiksel olarak hesaplanmıştır. Son olarak elde edilen sonuçlar spike örneklerin ortalama değerlerinden çıkarılarak gerçek verim sonuçları tespit edilmiştir. Tablo 1'de kör numunelerinin analiz sonuçları verilmiştir.

Tablo 1. Kör numune analiz sonuçları

Numune	PAH Türü						
	Bm.	Flt	BbF	BkF	BaP	BghiPe	IP
Blank 1	ppb	1,07	0,32	0,24	0,12	-	-
Blank 2	ppb	0,77	0,23	0,18	0,07	-	-
Blank 3	ppb	0,75	0,43	0,35	0,21	-	-
Blank 4	ppb	0,75	0,35	0,21	0,11	-	-
Blank 5	ppb	0,75	0,35	0,21	0,11	-	-
Ortalama	ppb	0,82	0,34	0,24	0,12	-	-
Ort./Derş. Fakt.(500)	ppb	0,0016	0,0007	0,0005	0,0002	-	-

Kör numune analizleri sonucunda standart katmalı örneklerin hazırlandığı ultra saf suda ortalama olarak 0,0016 ppb Floranten, 0,0007 ppb Benzo(b)floranten, 0,0005 ppb Benzo(k)floranten, 0,0002 ppb Benzo(a)piren varlığı tespit edilirken, Benzo(g,h,i)perilen ve İndeno(1,2,3-c,d)piren tespit edilememiştir.

3.2. PAH Standartlarının Analiz Sonuçları

Spike örnekler hazırlanırken ultra saf su üzerine eklenen 10 ppb'lik PAH standardından dört farklı numune hazırlanıp analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak geri kazanımda kullanılacak olan standardın gerçek değeri ile sonuç hesaplanmıştır. Tablo 2'de 10 ppb'lik PAH standartanaliz sonuçları verilmiştir.

Tablo 2. Tekrarlı PAH Standartlarının Analiz Sonuçları

	STD okuma 1	STD okuma 2	STD okuma 3	STD okuma 4	Ortalama	Birim
Flt	10,124	10,096	10,271	9,795	10,072	ppb
BbF	9,940	9,977	10,177	9,786	9,970	ppb
BkF	10,209	10,079	10,278	9,897	10,116	ppb
BaP	10,066	9,931	10,158	10,109	10,066	ppb
BghiPe	10,175	9,910	10,172	9,896	10,038	ppb
IP	10,065	10,036	10,090	10,297	10,122	ppb

3.3. Spike Örneklerin Analiz Sonuçları

Aynı içerikli on (10) adet spike örneği hazırlanmış ve örneklerin analiz sonuçlarının aritmetik ortalaması alınmıştır. Bu ortalama dan kör numunelerine ait analiz sonuçlarının ortalamaları çıkarılarak gerçek ölçülen değerler hesaplanmıştır. Tablo 3'te spike örneklerin analiz sonuçlarından elde edilen yüzde geri kazanım değerleri

Numune	PAH Türü					
	Flt	BbF	BkF	BaP	BghiPe	IP
Spike 1	10,977	8,681	8,586	9,301	6,608	8,048
Spike 2	9,458	9,130	8,020	10,238	7,090	9,018
Spike 3	9,748	8,704	8,464	8,727	8,064	8,453
Spike 4	9,204	10,650	9,375	9,750	8,779	8,022
Spike 5	9,920	8,726	8,717	9,110	5,488	9,728
Spike 6	10,964	8,491	8,262	8,600	7,408	5,837
Spike 7	7,626	7,866	7,795	8,147	7,165	6,525
Spike 8	11,636	9,879	9,824	10,172	8,339	9,545
Spike 9	11,943	8,713	7,763	8,241	7,021	7,078
Spike 10	8,777	9,383	8,951	9,419	9,348	7,808
Spike Ort.	10,025	9,022	8,576	9,171	7,531	8,006
Blank Değ.	0,0201	0,0180	0,0172	0,0183	-	-
Blank Düş.	10,024	9,022	8,575	9,170	7,623	8,002
STD. Ort.	10,072	9,970	10,116	10,066	10,038	10,122
% G.Kaz	99,5	90,5	84,8	91,1	75,9	79,1

verilmiştir.

Tablo 3. % Geri kazanım sonuçları

Gerçek ölçülen değerler tekrarlı standart okumalarının ortalama değerlerine bölünüp, yüz ile çarpıldığında geri kazanım çalışmalarının yüzde(%) verim sonuçları belirlenmiştir. Geri kazanım gibi diğer bir önemli hususta tekrarlanabilirliktir. Tekrarlanabilirlik standart sapma ve bağıl standart sapma ile belirlenebilmektedir. Tablo 4'te Modifiye metoda ait standart sapma ve % Bağıl standart sapma (RSD) sonuçları verilmiştir.

Tablo 4. Modifiye metoda ait yüzde bağıl standart sapma sonuçları

	Flt	BbF	BkF	BaP	BghiPe	IP
Spk ₁ -Std. _{ort.}	0,9053	0,1167	0,0001	0,0171	0,8512	0,0017
Spk ₂ -Std. _{ort.}	0,3215	0,0115	0,3083	1,1389	0,1946	1,0245
Spk ₃ -Std. _{ort.}	0,0766	0,1011	0,0124	0,1968	0,2840	0,1997
Spk ₄ -Std. _{ort.}	0,6740	2,6492	0,6382	0,3359	1,5573	0,0002
Spk ₅ -Std. _{ort.}	0,0111	0,0875	0,0199	0,0037	4,1721	2,9632
Spk ₆ -Std. _{ort.}	0,8810	0,2823	0,0987	0,3250	0,0151	4,7073
Spk ₇ -Std. _{ort.}	5,7584	1,3369	0,6089	1,0473	0,1343	2,1942
Spk ₈ -Std. _{ort.}	2,5936	0,7340	1,5581	1,0029	0,6525	2,3686
Spk ₉ -Std. _{ort.}	3,6830	0,0955	0,6598	0,8633	0,3631	0,8529
Spk ₁₀ -Std. _{ort.}	1,6758	0,3441	1,3560	0,4188	0,4760	5,3552
St. Sapma	1,29	0,76	0,73	0,73	0,93	1,40
Spk _{ort.}	10,025	9,022	8,576	9,171	7,531	8,006
%RSD	12,8	8,4	8,5	8,0	12,4	17,5

Modifiye metot ile EPA 550.1 metodu yüzde verimleri açısından karşılaştırıldığında, analizi yapılan altı PAH bileşeni için yalnız BghiPe parametresinde daha düşükken diğer beş PAH parametresi için modifiye metodunda daha yüksek verimler elde edilmiştir. Modifiye metot ile EPA 550.1 metodu yüzde bağıl standart sapma açısından da karşılaştırılmış olup, Flt, BkF, IP açısından modifiye metodun daha yüksek yüzde bağıl standart sapma değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Diğer 3 PAH parametresi için daha düşük yüzde bağıl standart sapma değerleri elde edilmiştir. Tablo 5'te EPA 550.1 metoduna ait PAH yüzde geri kazanım ve % yüzde bağıl standart sapma (RSD) sonuçları verilmiştir (EPA 1990).

Tablo 5. EPA 550.1 metoduna ait PAH yüzde geri kazanım ve %RSD sonuçları

Tekli laboratuvar geri kazanım ve standart sapma sonuçları				
Analit	Konsantrasyon (µg/L)	R ^a	S _r ^b	
Floranten	0.025	90.2	12.0	
Benzo(b)floranten	0.010	87.5	18.5	
Benzo(k)floranten	0.012	81.2	7.2	
Benzo(a)piren	0.050	76.5	10.3	
Benzo(g,h,i)perilen	0.050	81.5	13.0	
İndeno(1,2,3-c,d)piren	0.125	75.2	9.2	
R ^a = % geri kazanım				
S _r ^b = % standart sapma				

4. Sonuç

İçme suyunda PAH'ların analizi için standart bir analiz metodu olarak kullanılan EPA 550.1 analiz süresinin uzun olması ve kimyasal tüketim miktarının fazla olması nedeniyle rutin ve çoklu numune analizlerinde sorun oluşturmaktadır. Modifiye (inovasyon) metot olarak EPA 550.1 metodunun iyileştirilmesindeki amaç; EPA 550.1 metodunda belirtilen altı PAH parametresi için belirtilen verimlere ve yüzde bağıl standart sapma değerlerine, daha az kimyasal kullanımı ve daha kısa analiz süresinde ulaşmaktır. Modifiye edilen metotla, geri kazanım açısından değerlendirme yapıldığında beş PAH parametresinde başarı

sağlanmış olup, yalnız BghiPe daha düşük verim elde edilebileceği gözlenmektedir. BghiPe parametresinde verim daha düşük elde edilmesine rağmen güven aralığında EPA 550.1 standardının kabul ettiği verimlilik değerleri içinde yer almaktadır.

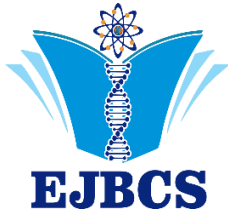
Modifiye metodun EPA 550.1 metodu ile karşılaştırılacağı bir başka husus ise harcanan kimyasal miktarıdır. EPA 550.1 metodunda toplam 135 mL kimyasal harcanırken modifiye metodunda 70 mL'lik bir kimyasal harcanması söz konusudur. Gerek maliyet gerekse de kimyasalların çevresel etkileri düşünüldüğünde, yaklaşık %50'lik kimyasal kullanımındaki azalma ile büyük kazanımlar sağlamaktadır. SPE işlemindeki kondisyon ve elüsyon basamaklarında daha düşük kimyasal kullanımı analiz süresini de olumlu olarak etkilemektedir. Bu basamaklardaki kimyasal geçişinin azalması analiz süresini kısaltmaktadır.

Tüm bu bilgilerin ışığında EPA 550.1'den modifiye edilerek geliştirilen, çalışmada belirtilen bu modifiye metodun içme suyunda altı PAH parametresinin rutin analizi için daha kullanışlı ve tasarruflu olduğu görülmektedir. EPA 550.1 yerine tercih edilebilecek bu modifiye metoda ait detaylı bilgiye "İçme sularında poliaromatik hidrokarbonların katı faz ekstraksiyon ile kromatografik analizlerine analitik yaklaşımlar" adlı yüksek lisans tez çalışmamdan ulaşılabilmektedir.

Kaynaklar

- Alver E, Demirci A, Özcimder M 2012. Microextraction Methods. Sigma J Eng & Nat Sci 30: 75-90
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)(1995) U.S. Department of Health and Human Services. "Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons" <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf> f (erişim tarihi:30 Temmuz 2019)
- Büyüktuncel E 2012. Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. HUIPHARM 32: 209-242
- Yalaki S. 2005. Adana Merkez ve Kırsal Alanlarda Trafiksel Kaynaklı Organik Hava Kirleticileri ve Atmosferik Poliaromatik Hidrokarbonlar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. <http://libratez.cu.edu.tr/tezler/5560.pdf> (erişim tarihi:30 Temmuz 2019)
- EPA (US Environmental Protection Agency) 1990. Environmental Monitoring Systems Lab. "Method 550.1 Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and Hplc with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection" Hodgeson JW. <https://www.o2si.com/docs/epa-method-550.1.pdf> (erişim tarihi: 30 Temmuz 2019)
- GC (Government of Canada) 2004. Canadian Environmental Protection Act. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons" www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/hydrocarb_ aromat_polycycl/hydrocarbons-hydrocarbures-eng.pdf (erişim tarihi: 30 Temmuz 2019)
- ISO (International Organization for Standardization) 2002. Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction. ISO copyright office

- Gülçiçek G. 2011. Topraktaki Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar(PAH) İçin Sınır Değerlerin Uygulanabilirliğinin Araştırılması. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. <https://polen.itu.edu.tr/bitstream/11527/8875/1/11285.pdf> (erişim tarihi: 30 Temmuz 2019)
- Hanedar A 2009. İstanbul'da Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Atmosferik Birikiminin ve Konsantrasyon Dağılımının Belirlenmesi. İtü Der/d9: 15-27
- Kumaz ÜS, Büyükgüngör H 2007. Kızılırmak Deltası kıyı şeridinde su ve midye örneklerinde PAH kirliliğinin araştırılması. İtü Der/e17: 15-22
- Mastral AM, Callen MS, Lopez JM, Garcia T, Navarro MV 2003. Critical Review on Atmospheric PAH, Assesment of Reported Data in The Mediterranean Basin. FPT 80: 183-193.
- Gaga EO. 2004. *Investigation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Deposition in Ankara* Middle East Technical University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.63.3.5672&rep=rep1&type=pdf> (erişim tarihi:30 Temmuz 2019)
- Pozzoli L, Gilardoni S, Perrone MG, Gennaro G, Rienzo M, VioneD 2004. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the atmosphere: monitoring, sources, sinks and fate. I: Monitoring and sources. Ann Chim 94: 17-33.
- Walker CH. 2001. Organic Pollutants: An Ecotoxicological Perspective. CRC Press



Antimicrobial activity of *Drosera peltata* J.E.Sm extracts against clinically isolated human cariogenic pathogens—an *in vitro* study

Raju Asirvatham^{1*}, Praveen Raj R¹

¹ Department of Pharmacology, St. Joseph's College of Pharmacy, Cherthala, Kerala, India.

*Corresponding author : rajuasirvatham@gmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-7939-4975>

Received :17/02/2020
Accepted : 30/04/2020

Abstract: Oral cariogenic bacterial infection causes development of dental caries. This caries become intensely painful and hard to eradicate these causing agents without side effect. The plant and the phytoconstituents have a promising therapeutic potential in the management of dental caries treatment. The study aimed to evaluate antimicrobial activity of chloroform, ethanol and aqueous extracts of *Drosera peltata* J.E.Sm against clinically isolated human cariogenic pathogens. Chloroform, ethanol and aqueous extracts of *D. peltata* were tested against the *Streptococcus mutans* (a bacterium) and *Candida albicans* (a non-filamentous fungus). They are causing dental caries and were isolated from caries infected patients. The above three extracts showed antimicrobial activity against both *S. mutans* and *C. albicans*. The zone of inhibition was found to be high with chloroform extract of *D. peltata*. It also showed the minimum inhibitory concentration against *S. mutans* than the aqueous and ethanol extracts to Mueller Hinton Broth (MHB).The plant *D. peltata* showed antimicrobial activity against dental caries such as *S. mutans* and *C. albicans*. It would be have therapeutic use for dental caries and other oral infections.

Keywords: *Drosera peltata*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, antimicrobial, zone of inhibition.

Drosera peltata J.E. m'nin klinik olarak izole edilmiş insan karyojenik patojenlerine karşı ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi - bir *in vitro* çalışma

Özet: Oral karyojenik bakteriyel enfeksiyon diş çürüğünün gelişmesine neden olur. Bu çürükler şiddetli ağrılı hale gelir ve bu neden olan ajanların yan etkisi olmadan ortadan kaldırılması zorlaşır. Bitki ve fito-bileşenlerin diş çürüğü tedavisinin tedavisinde umut verici bir terapötik potansiyeli vardır. Çalışma, klinik olarak izole edilmiş insan karyojenik patojenlerine karşı *Drosera peltata*'nin kloroform, etanol ve sulu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmeyi amaçladı. Kloroform, etanol ve *D. peltata*'nin sulu özleri, *Streptococcus mutans* (bir bakteri) ve *Candida albicans* (filamentöz olmayan bir mantar) karşı test edildi. Diş çürüğüne neden olurlar ve çürük bulaşmış hastalardan izole edilirler. Yukarıdaki üç ekstrakt hem *S. mutans* hem de *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdi. İnhibisyon bölgesinin, *D. peltata* kloroform özütü ile yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, *S. mutans*'a karşı, Mueller Hinton Broth'a (MHB) sulu ve etanol özütlerinden daha düşük önleyici konsantrasyon gösterdi. *mutans* ve *C. albicans*. Diş çürüğü ve diğer oral enfeksiyonlar için terapötik kullanım olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Drosera peltata*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, antimikrobiyal, inhibisyon bölgesi.

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Dental caries is one of the infectious microbial diseases caused by the bacterium *Streptococcus mutans* which leads to localized dissolution and destruction of the calcified tissues of the teeth. In presence of fermentable carbohydrates, this bacterium causes damage by liquefying tooth structures in result in dental caries. This dental caries and periodontal diseases are the most predominant and preventable infectious diseases in this world. The availability of antibiotics, associated adverse effects and cost of medicine used in dentistry, made dentists to consider

natural medicines for dental treatment. In recent years, the phytoconstituents which are isolated from the plant sources were given more attention by researchers to find out a good alternative for various diseases of oral cavity (Shyla, 2011).

One among such an alternative is *Drosera* species. They contain physiologically and pharmacologically active compounds such as flavonoids and naphthoquinones such as plumbagin. Various scientific studies reported that these flavonoids and naphthoquinones possess various therapeutic effects such as anticancer, antifertility, anticonvulsant, anti-inflammatory and antimicrobial

moreover the aerial parts of *D. peltata* was reported to have antimicrobial activity of on oral bacteria which was evaluated by using agar diffusion and dilution micro methods (Raju, 2013a; Raju, 2013b). Researchers reported that ethanol and aqueous extracts of Indian *D. peltata* showed protection over the cancer associated metabolic syndrome developed in Dalton's ascites lymphoma (DAL) and Ehrlich's Ascites Carcinoma (EAC) bearing mice (Raju, 2016a). Similarly, its antibacterial effect was also reported against clinically isolated human periodontal pathogens such as *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Raju, 2016b).

None of them investigated the antimicrobial effect of Indian *Drosera peltata* against dental caries caused by *S. mutans* (a bacterium) and *Candida albicans* (a non filamentous fungus). So the aim of present study was to investigate antimicrobial activity of chloroform, ethanol and aqueous extracts of *Drosera peltata* against clinically isolated human cariogenic pathogens.

2. Materials and methods

2.1 Plant materials

The whole plant of *D. peltata* was collected from Munnar hills, Kerala, India. It was identified and authenticated by Prof. Madhava Chetty, K., Taxonomist, S.V. University, Tirupati, Andhra Pradesh, India. The material was washed, shade dried, powdered and stored in air tight containers for further experiments.

2.2 Preparation of the extracts

2.2.1 Chloroform extract:

A weighed quantity of the air-dried powdered plant drug was extracted with chloroform (60-80°C) in a soxhlet apparatus.

2.2.2 Alcohol extract:

A weighed quantity of the air-dried powdered drug was extracted with ethanol (90 %v/v) in a soxhlet apparatus.

Both the extracts were concentrated in a rotary flash evaporator at a temperature not exceeding 50°C.

2.2.3 Aqueous extract:

The marc from the ethanol extract was macerated with chloroform- water for 24h to obtain the aqueous extract. This was concentrated under reduced and dissolved in distilled water for experimental studies.

The chloroform (CEDP), ethanol (EEDP) and aqueous (AEDP) extracts of *D. peltata* were stored in air tight containers for experimental study.

2.3 Microorganisms:

S. mutans and *C. albicans* were isolated from the dental caries of infected patients from the Dental clinic, Marthandam, Tamil Nadu, India.

2.4 Media Used: Thioglycolate broth (TGB) and brain heart infusion broth (BHI) are the transport media used to maintain clinical dental caries sample in viable condition. Thioglycolate broth (TGB) contained per liter of deionised

water: 15 g casein enzyme hydrolysate, 5 g yeast extract, 5.5 g dextrose, 2.5 g sodium chloride, L-cystine 0.5 g, 0.5 g sodium thioglycolate with a pH of 7.1 at 25°C. Brain heart infusion broth (BHI) contained, per liter of deionised water: 200 g calf brain infusion from, 250 g brain heart infusion from, 10 g protease peptone, 2 g dextrose, 5 g sodium chloride, 2.5 g disodium phosphate with a pH of 7.4 at 25°C.

Growth media used in examining the samples at aerobic condition includes, nutrient agar (NA), blood agar (BA) and MacConkey agar (MAC). Nutrient agar (NA) contained, per liter of deionised water: 5 g Hi veg peptone, 1.5 g Hi veg extract, 1.5 g yeast extract, 5 g sodium chloride, agar 15 g with a pH of 7.4 at 25°C. Blood agar (BA) is prepared by adding 20 mL of sheep blood to 200 mL of nutrient agar media as prepared like the above-mentioned composition. MacConkey agar (MAC) contained, per liter of deionised water: 17 g peptic digest of animal tissue, 3 g Protease peptone, 10 g lactose, 1.5 g Bile salts, 5 g sodium chloride, 0.03 g neutral red and agar 15 g with a pH of 7.1 at 25°C. For the examination of pathogenic fungi from dental caries sample, Sabouraud's dextrose agar (SDA) contained per liter of deionised water: 40 g dextrose, 10 g peptone and 20 g agar with a pH of 5.7 before autoclaving.

Growth media used to examine the samples at microaerophilic condition are brain heart infusion blood agar + 20% sucrose (BHIBA + 20% sucrose), thioglycolate agar (TGA) and trypticase yeast extract cystine sucrose bacitracin agar (TYCS20B) a medium for the selective isolation of *S. mutans* contained per liter of deionised water: 40 g trypticase soy agar (TSA), 5 g Bacto agar (Difco), 10 g yeast extract, 200 g sucrose. The medium was sterilized and cooled to 55°C 200 IE bacitracin was incorporated. BHI broth with agar served as brain heart infusion agar used for culturing of *S. mutans* under microaerophilic condition. TGB with agar 2 g served as thioglycolate agar (TGA) used for culturing of *S. mutans* under microaerophilic condition.

2.5 Sample collection: This procedure was carried out under aseptic condition, by using an excavator dental caries. Samples were collected and hosted into the 2mL TGB or BHI broth and later it was mixed well by using magnetic stirrer. After that the organisms were inoculated in their culture medium by streak plate technique.

2.6 Antimicrobial susceptibility assay

2.6.1 Disc diffusion assay

In this method, plates were prepared with 20mL of sterile BHI for *S. mutans* and MHA for *C. albicans*. The test cultures (100 µL of suspension containing 10⁸CFU/mL bacteria (or microorganisms under study) were swabbed on the top of the solidified media and allowed to dry for 10min. The tests were conducted at three different concentrations of the crude extract (200 mg, 5mg and 2.5mg per disc) dissolved in 5% dimethyl sulfoxide (DMSO). The sterile 6mm disc (Himedia) impregnated with different concentrations of extracts. The loaded discs were placed on the surface of the medium and left for 30min at room temperature for compound diffusion. Negative control was prepared using respective solvent. Penicillin and Amphotericin-B (5 and 10 µg /disc) were used as positive

control. The plates were incubated for 24 h at 37°C. Zone of inhibition was recorded in millimeters and the experiment was repeated twice (Paper, 2005; Sunaina 2013).

2.6.2 Minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) was performed according to the standard reference method (Paper 2005; Sunaina 2013). The extracts were dissolved in water and 2% dimethyl sulfoxide (DMSO). The concentrations of extracts were prepared in 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.4, 4.7, 2.35 and 1.2 µg/ml respectively. The initial test concentration was serially diluted twofold. Each well was inoculated with 5 µL of suspension containing 10⁸CFU/mL of bacteria and fungi. The antibacterial agent penicillin and antifungal agent Amphotericin-B were included in the assays as positive controls. The plates with bacteria were incubated for 24 h at 37°C. After incubation, 5 µL of tested broth was placed on the sterile MHA and BHI plates and incubated at respective temperature. The MIC for bacteria was determined as the lowest concentration of the extracts inhibiting the visual growth of the test cultures on the agar plate. Three replications were maintained.

2.7 Statistical analysis

All triplicate data were presented in mean ± Standard Deviation (S.D) manner.

3. Results

Table 1 showed the effect of CEDP, EEDP and AEDP on *S. mutans* and *C. albicans* isolated from the dental caries of infected patients by disc diffusion method. Three extracts were tested against *S. mutans*, and *C. albicans* where the zone of inhibition was measured and presented in millimetre. The results were compared with standard antibiotics such as Penicillin and Amphotericin B. The zone of inhibition was increased in a concentration dependent manner for all the extracts. The highest diameter of zone of inhibition (44.7±1.0) was found with 16mcg/mL of CEDP against *S. mutans* whereas 10 mcg/mL of Penicillin showed 47.6±3.1 and 44.3±1.2 for Amphotericin B. The zone of inhibition was 42.7±1.8 for *C. albicans* shown by CEDP. Similarly, the highest concentration of EEDP showed 34.8±3.6 and 33±1.6 for zone of inhibition against *S. mutans*, and *C. albicans* respectively. The result was comparatively like that of 5mcg/mL of standard Amphotericin B drugs. The highest dose of AEDP showed the maximum zone of inhibition (18±2.5) against *C. albicans*, however the results given by the AEDP was comparatively lesser than the standard and other extracts.

CEDP- chloroform extracts of *D. peltata*, EEDP – ethanol extracts of *D. peltata*, AEDP- aqueous extracts of *D. peltata*

Table 2 showed the MIC by visual observation produced by the extracts CEDP, EEDP and AEDP against *S. mutans* and *C. albicans*. The results were compared with

standard antibiotics such as Penicillin and Amphotericin B. In a series of dilution, the MIC of CEDP was found to be least (2.35mcg/mL) than other extracts on *C. albicans* whereas it was the next higher dose (4.7mcg/mL) for *S. mutans*. Similarly, 1.25mcg/mL of Penicillin and 5 mcg/mL of Amphotericin B were showed inhibition of growth on all the tested pathogens. In case of EEDP the minimum concentration required for the inhibition of dental pathogens growth were 9.4 and 4.7mcg/mL against *S. mutans* and *C. albicans* respectively. AEDP consumed 18.75mcg/mL for growth inhibition of *C. albicans*.

Table 1 Zone of inhibition of extracts against *S. mutans* and *C. albicans* isolated from cariogenic pathogens.

Name of antimicrobial	Concentration per disc (mcg/mL)	Zone of Inhibition (mm)	
		Name of microorganism	
		<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
CEDP	1	11.3±0.1	12.4±1.7
	2	18.6±2.3	20.3±0.5
	4	24.2±1.0	30.4±0.5
	8	36.1±2.1	36.1±3.2
	16	44.7±1.0	42.7±1.8
EEDP	1	7.2±0.01	5.8±1.7
	2	11.5±1.6	12.2±1.7
	4	21.5±3.4	21.9±0.8
	8	26.5±2.1	17.3±1.5
	16	34.8±3.6	33±1.6
AEDP	1	2.2±1.1	2.8±0.6
	2	9.6±1.3	7.5±1.1
	4	10.3±1.5	15.5±1.3
	8	11.3±0.9	16±1.8
	16	12.1±1.3	18±2.5
Penicillin	5	28.1±2.1	22.8±1.9
	10	47.6±3.1	39.4±1.1
Amphotericin B	5	31.7±3.2	38.1±2.6
	10	44.3±1.2	47±1.8

Table 2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of CEDP, EEDP and AEDP by visual observation

Name of Antimicrobial	Minimum Inhibitory Concentration (MIC in mcg/mL)	
	Name of microorganism	
	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
CEDP	4.7	2.35
EEDP	9.4	4.7
AEDP	9.4	18.75
Penicillin	2.5	1.25
Amphotericin B	5	5

CEDP- chloroform extracts of *D. peltata*, EEDP- ethanol extracts of *D. peltata*, AEDP- aqueous extracts of *D. peltata*

4. Discussion

S. mutans is an acid producing pathogen which causes dental plaque and dental caries. It is characterized by bad breath and foul tastes. If it is not treated initially the infection spread from the tooth to surrounding tissues net result in an edentulous mouth. Penicillin and erythromycin are the standard drugs generally prescribed for prevent dental caries in humans, but nowadays they are rarely used clinically due to its adverse effects. Recently natural remedies from medicinal plants are good alternative for antibiotic and are free from hypersensitivity reaction, supra infections and teeth staining (Duraipandiyar, 2007; Shyla, 2011; Sevindik et al., 2017; Mohammed et al., 2018; Mohammed et al., 2019). The study results suggest that chloroform extract showed significant antibacterial activity in all the assay methods moreover it showed the potency which is equivalent to standard antibiotics Penicillin and Amphotericin B.

Droserae Herba a formulation contains dried plant of *Drosera* (aerial part) in the form of extracts used for the treatment of various ailments. *D. rotundifolia* also a carnivorous plant its ethanol and aqueous extracts inhibits neutrophil elastase in human and also showed antispasmodic effect on guinea pig ileum experiment. *D. peltata* extracts antimicrobial activity was studied on oral bacteria by agar diffusion in which chloroform extract showed highly significant antimicrobial effect (Duraipandiyar, 2007; Singh 2007; Shyla, 2011). Similarly, Indian *D. peltata* J.E.Sm. also exhibited significant antibacterial effects on clinically isolated human dental caries. The orders of antimicrobial effects were CEDP> EEDP> AEDP. Its antibacterial effect might be their bioactive compounds such as flavonoids and naphthoquinones such as plumbagin.

Conclusion

Bacterial resistance to antibiotics is an important issue which leads to development of newer and safer antimicrobials for prevention and treatment of oral infection. From the present study results it is evident that the plant *D. peltata* showed antimicrobial activity against dental caries such as *S. mutans* and *C. albicans*. It would be a therapeutically useful drug for the treatment of dental caries and other oral infections.

Acknowledgement

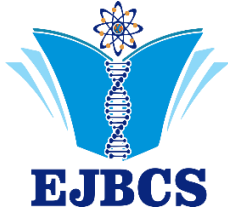
The authors gratefully acknowledge Dental clinic, Marthandam, Tamil Nadu, India for providing support as an isolation of organism and facilities for this research work. The authors also thank Dr. SN Yoganarasimhan for his guidance in the selection and collection of plant material.

Conflicts of Interest: No

References

Duraipandiyar V, Ignacimuthu S 2007. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: an ethnomedicinal plant. J Ethnopharmacol. 112(3): 590-594.

- Mohammed FS, Akgul H, Sevindik M, Khaled BMT 2018. Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. Fresenius Environ Bull 27(8): 5694-5702.
- Mohammed FS, Pehlivan M, Sevindik M 2019. Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities of Different Extracts of *Silybum marianum* Collected from Duhok (Iraq). Int J. 6(4): 317-322.
- Paper DH, Karall E, Kremser M, Krenn L 2005. Comparison of the antiinflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay. Phytother Res. 19(4): 323-326.
- Raju A, Christina AJM, Murali A 2013a. *In vitro* antioxidant and anticancer activity studies on *Drosera indica* L. (Droseraceae). Adv Pharm Bull. 3(1): 115-120.
- Raju A, Christina AJM, Murali A 2013b. Effect of *Drosera burmannii* Vahl on metabolic syndrome developed in Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) bearing mice. Phytopharmacology. 4(1): 53-60.
- Raju A, Seeja S Raj, Balaji VR 2016a. An *in vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Drosera peltata* J.E.Sm against clinically isolated human periodontal pathogens. Int. J Med Res Pharm Sci. 10(3): 115-120.
- Raju A, Raj SS, Josphin A, Christina M 2016b. Modulatory effect of *Drosera peltata* J.E.Sm on development of metabolic syndrome in tumor bearing mice. Indonesian J Pharm. 27(4): 203-210.
- Sevindik M, Akgul H, Pehlivan M, Selamoglu Z 2017. Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. Fresen Environ Bull. 26(7): 4757-4763.
- Shyla JH, Kingsley JS, Sathish ES, Priya D 2011. Antimicrobial activity of few medicinal plants against clinically isolated human cariogenic pathogens-An *in vitro* Study. ISRN Dentistry. 1-6
- Singh J, Kumar A, Budhiraja S, Hooda A 2007. Ethnomedicine: use in dental caries. Braz. J.Oral.Sci. 6 (21): 1308-1312.
- Sunaina S, Thomas B, Shetty V, Bhandary R, Shetty RM 2013. An *in vitro* evaluation of the efficacy of garlic extract as an antimicrobial agent on periodontal pathogens: A microbiological study. AYU. 34(4): 445-451.



The First Records of Three Moths Species (Lepidoptera) in Osmaniye Province of Turkey and Notes on External and Genital Morphology of The Species

Erol ATAY^{1*}, Yusuf HÜSEYİNOĞLU², Mahmut TATLI³

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

²Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Mersin University, Mersin, Turkey

³Institute of Science, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey

*Corresponding author : eatay@mku.edu.tr

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

Received : 05/03/2020

Accepted : 30/04/2020

Abstrac: This study was conducted as field and laboratory studies in Osmaniye province. Two species belonging to Noctuidae family *Helicoverpa armigera* and *Chrysodeixis chalcites* and one species belonging to Sphingidae family *Daphnis nerii* were caught with insect net, mercury vapour light trap and white screen, at different altitudes, with various vegetation in Osmaniye. In the field studies, *Helicoverpa armigera* totally 3 male and 3 female, *Chrysodeixis chalcites* totally 5 male and *Daphnis nerii* 1 male and 1 female were collected. Specimens were dissected in the laboratory and prepared genitalia and wings slides. We described the external and male-female genital morphology of *H. armigera*, *C. chalcites* and *D. nerii* in detail and also diagnostical morphological features. As a result of the study, *H. armigera*, *C. chalcites* and *D. nerii* are first record for Osmaniye.

Keywords: *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis chalcites*, *Daphnis nerii*, Noctuidae, Sphingidae, Lepidoptera.

Osmaniye’de üç güve türünün (Lepidoptera) İlk Kaydı ve Türlerin Dış ve Genital Morfolojileri Üzerine Notlar

Özet: Bu çalışma, Osmaniye ilinde arazi ve laboratuvar çalışmaları şeklinde yürütülmüştür. Nocuidae familyasına ait *Helicoverpa armigera* (Hübner, [1808]), *Chrysodeixis chalcites* (Esper, [1789]) ve Sphingidae familyasına ait *Daphnis nerii*, Osmaniye’de değişik bitki örtüsüne sahip çeşitli yüksekliklerdeki lokalitelerden cıva buharlı ışık tuzağı ve beyaz perde ile yakalandı. *Helicoverpa armigera*’dan toplam 3 erkek, 3 dişi, *Chrysodeixis chalcites*’den toplam 5 erkek ve *Daphnis nerii*’den bir erkek ve bir dişi toplanmıştır. Örnekler laboratuvarında preparat yapımı için hazırlandı, erkek-dişi genital ve kanat preparatları yapıldı. *H. armigera*, *C. chalcites* ve *D. nerii*’nin dış morfolojisi ve genital organları ayrıntılı olarak tanımlandı. Sonuç olarak, *H. armigera*, *C. chalcites* ve *D. nerii* türleri Osmaniye ili için ilk kayıttır.

Anahtar Kelimeler: *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis chalcites*, *Daphnis nerii*, Noctuidae, Sphingidae, Lepidoptera.

1. Introduction

The family Noctuidae is members of Noctuoidea. There are 35 thousand species this of family distributed worldwide (Atay and Kılıç, 2014); in Turkey 1242 species and in Osmaniye 27 species (Koçak and Kemal, 2018). The genus *Helicoverpa* Hardwick, 1965 (Lepidoptera: Noctuidae) includes *Helicoverpa armigera* (Hübner, [1808]) (Karsholt and Razowski, 1996). Common name of this species are African bollworm, cotton bollworm, corn earworm and old world bollworm. *H. armigera* is a highly polyphagous species. The most important crop host of which *H. armigera* is a major pest are tomato, cotton, pigeon pea, chickpea,

sorghum and cowpea. Other hosts includedianthus, rosa, pelargonium, chrysanthemum, groundnut, okra, peas, field beans, soybeans, lucerne, *Phaseolus* spp., other Leguminosae, tobacco, potatoes, maize, flax a number of fruits (Prunus, Citrus), forest trees and a range of vegetable crops (Lammers and MacLeod, 2007). *H. armigera* is feeding on about 200 plant species. This species is the major pest of cotton, corn and tomato in Turkey (Koçlu and Karsavuran, 2000; Konuş and Karaağaç, 2014). Like other Noctuidae species, the adults emerge after sunset and being active at night. This species may migrate over long distances, borne by winds. *H. armigera* has recently

extended its already considerable geographical range from Europe, Africa, Asia and Australasia to the New World (Kriticos et al., 2015), South America (Queiroz-Santos et al, 2018). In Turkey, Adana, Ağrı, Amasya, Ankara, Artvin, Bitlis, Bolu, Bursa, Denizli, Erzurum, Eskişehir, Giresun, Hakkari, Hatay, Mersin, Kars, Kastamonu, Malatya, Kahramanmaraş, Mardin, Muş, Nevşehir, Niğde, Rize, Siirt, Sinop, Sivas, Trabzon, Şanlıurfa, Van, Kırıkkale, Ardahan (Koçak and Kemal, 2018), Çanakkale (Genç et al, 2017), Manisa (Koçlu and Karsavuran, 2000).

The genus *Chrysodeixis* Hübner, [1821] (Lepidoptera: Noctuidae) includes *Chrysodeixis chalcites* (Esper, [1789]) (Karsholt and Razowski, 1996). *C. chalcites* is polyphagous multivoltin species (Murillo et al, 2013), larvae of which feed on a wide variety of leaves and fruits of vegetables, fruit and ornamental plants. *C. chalcites* (Golden twin spot moth) is distributed between 45°N and 35°S from southern Europe, the Mediterranean, and the Middle East to Africa (Murillo et al, 2013), Saint Helena Island (Karisch et al, 2018). In Turkey, Adana, Amasya, Ankara, Antalya, Bursa, Hatay, Mersin, Kars, Kahramanmaraş, Siirt, Trabzon, Şanlıurfa (Koçak and Kemal, 2018), Mersin (Topakcı et al, 2019). *C. chalcites* is a major pest of tomato, lucerne, alfalfa, clover, soybean and potato (Murillo et al, 2013). In Turkey also, it damages cucumber, tomato and green pepper (Topakcı et al, 2019).

Sphingidae (Lepidoptera) species are called hawk moths or sphinx (Akkuzu et al, 2007). Hawk moths are stout bodied moths with long narrow front wings. The family Sphingidae Latreille, 1802, contains 1450 species after the adults of which are often seen feeding in front of flowers. Their larvae are large and have a distinctive horn at their rear. As a group they are widely distributed across the world except in Antarctica (Katbeh-Bader, 2014). The genus *Daphnis* Hübner is known by nine species from different parts of the globe which are dark green to greenish brown with a characteristic wing pattern of paler fasciae (Kaleka et al, 2015). The family Sphingidae contains 36 species in Turkey, only two of these species in Osmaniye (Koçak and Kemal, 2018). *Daphnis nerii* (Linnaeus, 1758) (Oleander Hawkmoth) was common on oleander (Apocynaceae) in Mediterranean region (Moore and Miller, 2008). *D. nerii* is widely distributed in the world (India, Africa, Asia and Europe (Kaleka et al, 2015). In Turkey, Antalya, Aydın, Hakkari, Hatay, Mersin, İstanbul, İzmir, Konya, Kahramanmaraş, Muğla, Van (Koçak and Kemal, 2018), Çanakkale (Tiftikci and Kornoşor, 2016).

As a result of the study, *H. armigera*, *C. chalcites* and *D. nerii* are first record for Osmaniye.

2. Materials and Method

This study was conducted as field and laboratory studies in Osmaniye province.

2.1. Field Studies

Field studies were carried out in the localities of different altitudes and vegetation covers in the Osmaniye province in 2019. All the field works were done under suitable weather conditions (without precipitation and strong winds), and started early in the morning and continued until sunset in day. In addition, samples were collected between 20:00 and 24:00 hours with the help of mercury vapour light trap and white screen. Two species belonging to Noctuidae family *Helicoverpa armigera* and *Chrysodeixis chalcites* and one species belonging to Sphingidae family *Daphnis nerii* were caught at intervals with insect net, mercury vapour light trap and white screen in different localities, at different elevations, in different climatic conditions, plant cover and surface features in Osmaniye. In the field studies, *Helicoverpa armigera* totally 3 male and 3 female, *Chrysodeixis chalcites* totally 5 male and *Daphnis nerii* 1 male and 1 female were collected.

2.2. Laboratory Studies

Before losing body water, the collected specimens were sorted according to body sizes, and were needed with a number 2 and 3 insect needles that matched the size of the custom sized boards, strain and inhibition couples were strained in laboratory work. For the drying of the stretched specimens, they were kept at room temperature for two weeks in a dark and dry place. Male and female genital organs of species were prepared for the identification of the species following morphological examinations and measurements on the male and female specimens. The needling of the moths, stretching of the wings and genital organ preparations were done accordingly the methods that defined in Atay's work (2006). The major taxonomic characters of species were described. Important morphological organs of *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis chalcites* and *Daphnis nerii* were photographed and drawn. The specimens were stored at the Biology Department of Mustafa Kemal University in Hatay.

3. Results

Genus *Helicoverpa* Hardwick, 1965 (Lepidoptera: Noctuidae)

Syn: *Helicoverpa* Hardwick, 1965 (Koçak and Kemal, 2018)

Helicoverpa armigera (Hübner, [1808])

Syn: *obsoleta* auct. Nec Fabr., 1775; *barbara* Fabricius, 1794 [rejected]; *armigera* Hübner, [1808]; *pulverosa* Walker, [1857]; *uniformis* Wallengren, 1860; *rama* Bhattacharjee & Gupta, 1972 (Koçak and Kemal, 2018).

Materials Examined

18.IV.2019 2♂, 1♀; 15.V.2019 1♂, 1♀; 15.VI.2019 1♀
(37°05'43" N; 36°18'39" E, 183 m; 37°04'40" N; 36°12'03"
E, 175 m; 37°02'45" N; 36°17'44" E, 281 m)

Measurements

Body Length ♂: 15-16 (15,5) mm, ♀: 14-15 (14,5) mm
Wingspan ♂: 33-35 (34) mm, ♀: 30-34 (32) mm

Male (Figure 1): On the head vertex and frons grayish yellow or light brown. Antenna filiform, not sexually dimorphic; it's length about 6 mm and it's length 0,60 times longer than forewing length. Labial palpus well developed, long, very little recurved upwards. All segments of labial palpus are grayish yellow scales; approximately twice as long as head in lateral view; first (proksimal) segment shorter than second segment; third (distal) segment reduced in size compared to other two segment. Maxillary palp reduced. Eyes with brownish are very large and semioval. Haustellum is well developed and it's length approximately 6 times eye width. On the head ocelli and chaetosemata present. Head 1,53 times wider than it's height (Figure 2). On the thorax is pale grayish yellow or light brown.

Forewings are narrow and approximately triangular-shaped, it's length 1,30 times longer than it's width. The upper surface of the forewings; dull greenish to gray or light brown; dark band is situated between external transversal and submarginal lines; transversal lines, submarginal line and reniform spot are diffused. Fringe is very short. The ventral surface of the forewings; completely with pale grayish yellow or beige; reniform spot and small spot very dark gray. Hindwings are broad and it's length 2,10 times longer than it's width. The upper surface of the hindwings; pale yellow with brown band before external edge; dark round spot is situated in the middle of wing. Fringe is short. The ventral surface of the hindwings; similar to forewing, but no reniform spot.

Female moth is similar to male, but forewings orange brown.

The male genital organ is as Figure 3.

Valva is quite long and narrow; it's length 5,6 times longer than it's width. Sacculus is wide anteriorly. Uncus is long, hook shaped, it's apical portion covered with short setae. Tegumen narrow. Gnathos linked to tegumen by a tenuous membrane, projected posteriorly towards uncus apex. Saccus small and quite roundlong. Aedeagus is very long, cylindrical and narrow, it's length 6,75 times longer than it's width; with 11 sclerotized small nail like cornuti. Bulbus ejaculatorius is well developed.

The female genital organ is as Figure 4.

Apophysis posterioris and apophysis anterioris are well developed and narrow; the anterior one slightly curved; the posterior one straight. Bursae copulatrix well developed and membranous, with 4 signa. Spermatheca long, helical, twice as long as bursae copulatrix.

Veins of forewing and hindwing are drawn (Figure 5).



Figure 1. Adult of *Helicoverpa armigera* (Noctuidae) (Male and Female)



Figure 2. The head structure of *Helicoverpa armigera*



Figure 3. The Male Genitalia of *H. armigera* (Valva and Aedeagus, A- Cornutus; B- Bulbus ejaculatorius).

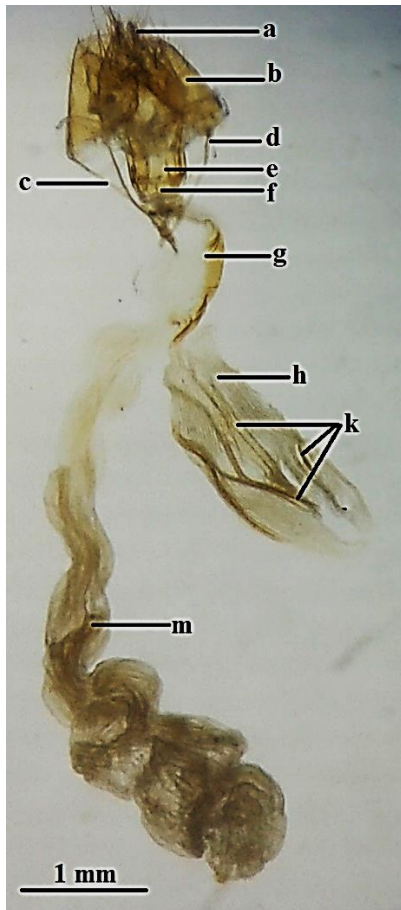


Figure 4. The Female Genitaliae of *H. armigera* (a- Papilla analis, b- Tegum VIII, c- A. anterioris, d- A. posterioris, e- Lamela postvaginalis, f- L. antivaginalis, g- Ductus bursae, h- Bursae copulatrix, k- Signa, m- Spermatheca).

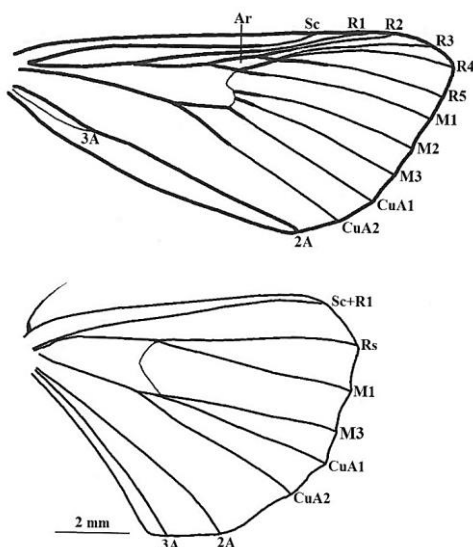


Figure 5. Veins of forewing and hindwing of *H. armigera*

Genus *Chrysodeixis* Hübner, [1821] (Lepidoptera; Noctuidae)

Syn: *Chrysodeixis* Hübner, [1821]; *Neoplusia* Okano, 1963 (Koçak and Kemal, 2018).

***Chrysodeixis chalcites* (Esper, [1789])**

Syn: *chalcites* Esper, [1789]; *chalsytis* Hübner, 1790; *bengalensis* Rossi, 1794; *quaestionis* Fabricius, 1794; *verticillata* Guenee, 1852; *integra* Walker, 1858; *adjuncta* Walker, 1865 (Koçak and Kemal, 2018).

Materials Examined

10.VI.2019 3♂; 10.VII.2019 2♂; (37°05'43" N; 36°18'39" E, 183 m; 37°04'40" N; 36°12'03" E, 175 m; 37°02'45" N; 36°17'44" E, 281 m)

Measurements

Body Length ♂: 15-16 (15,5) mm; Wingspan ♂: 33-34 (33,5) mm

Male (Figure 6): On the head vertex and frons golden brown. Antenna filiform, fuscous brown and long, it's length 0,65 times longer than forewing length. Labial palpus well developed, pale brown, recurved upwards and almost reaches to frons. All segments of labial palpus are covered with smooth scales over them. Eyes are light brownish and very large. Haustellum is well developed. On the head ocelli large, but chaetosemata absent. Head 1,75 times wider than it's height (Figure 7).

Thorax is golden brown color. There are two prominent crests on the thorax .

Forewings are wide and almost triangular-shaped, it's length 2 times longer than it's width. The upper surface of the forewings; ground color golden-orange to bronze-brown, slightly speckled with gray brown; terminal line pale brown on anterior half; with a silver or bright white stigma usually consisting of two similar oval spots. Fringe is long and pale brownish beige. The ventral surface of the forewings; completely with pale beige. Hindwings are broad and it's length 1,25 times longer than it's width. The upper surface of the hindwings are completely with pale brown-gray, darker towards margin, with dark gray veins. Fringe is short and pale tan. Abdomen is pale yellowish beige, Males with tufts of yellowish beige long scales on sides of abdomen, and black scales at apex ventrally.

The male genital organ is as Figure 8.

The genitalia are characterized by valva elongate and wider at base than towards the apex, quite long and narrow; it's length 6,55 times longer than it's width, with a tight group of setae at the apical margin. Teguman is quite broad. Uncus is long, hook shaped, its apical portion covered with short setae. Saccus is very elongate and V shaped. Aedeagus is very elongate and with a bulbous base, with several apical cornuti; basal cornutus is very elongate.

Veins of forewing and hindwing are drawn (Figure 9).



Figure 6. Adult of *Chrysodeixis chalcites*



Figure 7. The head structure of *Chrysodeixis chalcites*



Figure 8. The Male Genitalia of *Chrysodeixis chalcites* (General Structure and Aedeagus)

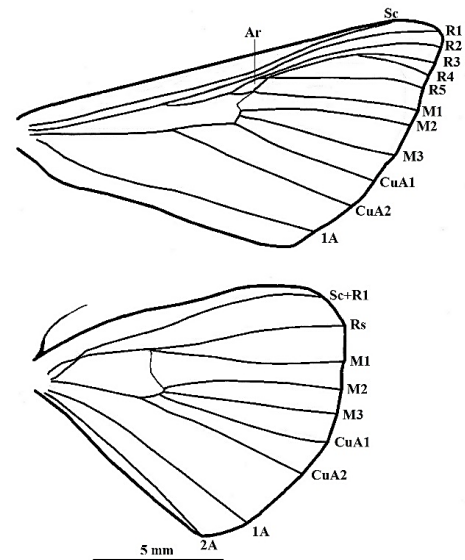


Figure 9. Veins of forewing and hindwing of *Chrysodeixis chalcites*

Genus *Daphnis* Hübner, [1819] (Lepidoptera; Sphingidae)

Syn: *Daphnis* Hübner, [1819]; *Regia* Tutt, 1903 (Koçak and Kemal, 2018).

Daphnis nerii (Linneaus, 1758), *Syst. Nat.*, 10: 490; id., 1767, *Syst. Nat.*, 12: 798; Cramer, 1779, *Pap. Exot.*, 2: 51 (Kaleka et al, 2015).

Syn: *nerii* Linneaus, 1758; *infernelutea* Saalmüller, 1884; *confluens* Closs, 1912; *nigra* Schmidt, 1914; *bipartita* Gehlen, 1934 (Koçak and Kemal, 2018).

Materials Examined

15.VIII.2019 1♂; 25.IX.2019 1♀; (183 m; 37°04'40" N; 36°12'03" E, 175 m; 37°02'45" N; 36°17'44" E, 281 m)

Measurements

Body Length ♂: 56 mm; ♀: 60 mm

Wingspan ♂: 110 mm; ♀: 115 mm

Male (Figure 10): On the head vertex and frons green; frons broadly rounded. Antenna thick, greenish beige and not long, 15 mm; it's length 0,35 times longer than forewing length. Labial palpus well developed, upturned, smoothly scaled, grayish green, broad with basal segment slightly longer than second; the third segment is shorter about one fifth of the second segment. Eyes are dark brownish and very large. Haustellum is well developed. Head 1,15 times wider than it's height.

Thorax is green and there are darker triangular shapes in the form of a collar.

Forewings are large and long almost triangular-shaped; it's length 2,5 times longer than it's width. The upper surface of the forewings; ground color green with basal beige patch and a black spot on it; postbasal and discal areas are with light pink transverse band. The ventral surface of the forewings; completely with pale grayish green; submarginal band is very thin and white. Hindwings are small and it's length 2,5 times longer than it's width. The upper surface of the hindwings are with pale brown-gray and green; submarginal band is thin and white.

The male genital and female organs are as Figure 11, 12. The male genitalia; uncus long, broad at base, gradually narrowing towards tip and strongly curved. Gnathos much shorter than uncus, triangular, broad at base, well sclerotized and hood like distally. Tegumen somewhat oblongate, broad, slightly sclerotized and almost of same length of vinculum. Valva very broad, it's length 2,35 times longer than it's width; costa semi sclerotized and dense setosed. Harpe is curved sharp basal process and densely dentate dorsally. Aedeagus is narrow and long, it's length 7,70 times longer than it's width, having distal end somewhat anchor shaped thecal appendage; vesica sclerotized and without any armature.

The female genitalia; posterior apophysis long and narrow; anterior apophysis shorter than posterior apophysis. Ductus bursae large, broad, tubular with sclerotized proximal part. Corpus bursae large and balloon like with tubular shaped longitudinal signum.

Veins of forewing and hindwing are drawn (Figure 13).



Figure 10. Adult of *Daphnis nerii*

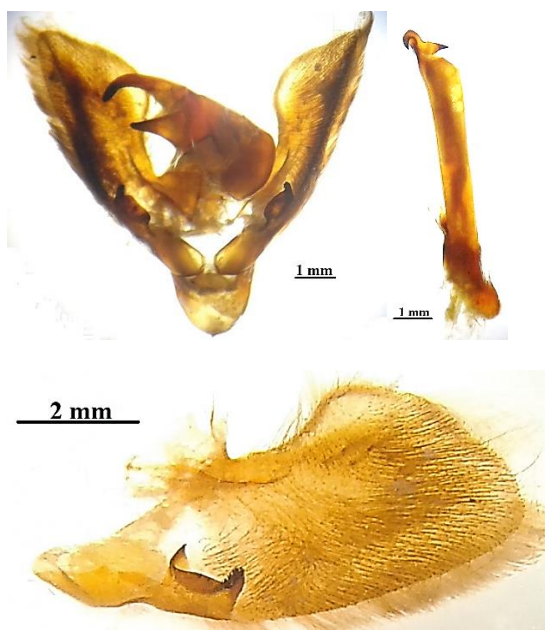


Figure 11. The Male Genitaliae of *Daphnis nerii* (General Structure, Aedeagus and Valva)



Figure 12. The Female Genitaliae of *Daphnis nerii* (General Structure)

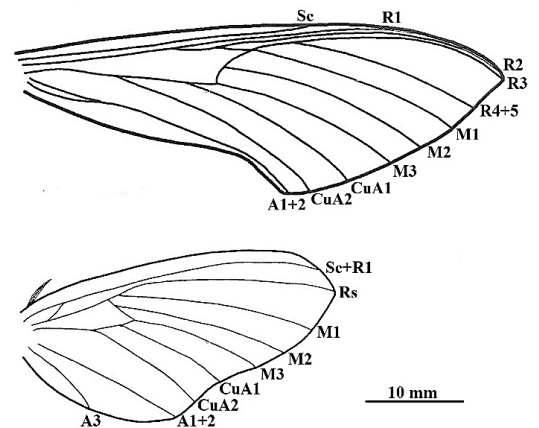


Figure 13. Veins of forewing and hindwing of *Daphnis nerii*

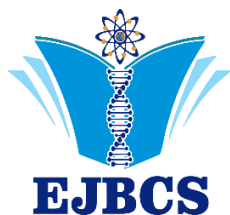
In this study, we described the external and the male-female genital morphology of *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis chalcites* and *Daphnis nerii*. The important taxonomic characters belong to them were redescribed in detail by comparison of different parameters with each other. Each one of the external and genital taxonomic characters were measured with digital caliper and stereo microscope.

As a result of the study, *H. armigera*, *C. chalcites* and *D. nerii* are first record for Osmaniye.


References

Akkuzu E, Ayberk H, Inac S 2007. Hawk Moths (Lepidoptera: Sphingidae) of Turkey and their zoogeographical distribution. Journal of Environmental Biology 28(4): 723-730.
 Atay E 2006. The Identity of *Parapoynx affinalis* (Guenee, 1854) (Lepidoptera, Crambidae, Nymphulinae) in Turkey. Journal of Entomology, 3(1), 76-81.
 Atay E, Kılıç U 2014. *Acontia lucida* (Hufnagel, 1799)

- (Lepidoptera: Noctuidae: Acontiinae) Hatay için yeni kayıt. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 4(10): 15-19.
- Genç H, Yücel S, Akçal A 2017. Observation *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) infestation on *Gladiolus grandiflorus* (Iridaceae) in Çanakkale. ÇOMU J. Agric. Fac. 5(1): 105-114.
- Lammers JM, MacLeod A 2007. Report of a pest risk analysis *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). Agriculture, Nature and Food Quality, pp. 1-18.
- Kaleka AS, Singh D, Kaur P 2015. Genitalic studies of two species of genus *Daphnis* Hübner (Sphingidae: Lepidoptera) from India. J. Chem. Bio. Phy. Sci. B. 5: 1531-1537.
- Karisch T, Kramp K, Peters R 2018. Notes on the genus *Chrysodeixis* Hübner, [1821] (Lepidoptera: Noctuidae) on St Helena Island. Metamorphosis Lepidopterists' Society of Africa 29: 137-145.
- Karsholt O, Razowski J 1996. The Lepidoptera of Europe A Distributional Checklist. Apollo Books. Denmark, 380 pp.
- Katbeh-Bader A 2014. Contribution to the Hawk Moths (Sphingidae: Lepidoptera) of Jordan. Jordan Journal of Natural History: 59-82.
- Koçak AÖ, Kemal M 2018. A synonymous and distributional list of the species of the Lepidoptera of Turkey. Centre for Entom Studies Ankara 8: 1-489.
- Koçlu T, Karsavuran Y 2000. *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)'nın Manisa ilinde biyolojisi ve popülasyon düzeyi. Türk Entomol. Derg. 24(3): 179-194.
- Konuş M, Karaağaç SU 2014. Adana'da pamukta yeşilkurt (*Helicoverpa armigera* (Hübner))'un insektisitlere karşı dayanıklılık oranlarının belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilim. Derg. 29(2): 106-112.
- Kriticos DJ, Ota N, Hutchison WD, Beddow J, Walsh T, Tay WT, Borchert DM, Paula-Moreas SV, Czapak C, Zalucki MP 2015. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? Plos One, 24 pp. DOI: 10.1371/journal.pone.0119618.
- Moore A, Ross HM 2008. *Daphnis nerii* (Lepidoptera: Sphingidae), anew pest of Oleander on Guam, including notes on plant hosts and egg parasitism. Proc. Hawaiian Entomol. Soc. 40: 67-70.
- Murillo H, Hunt DWA, VanLaerhoven SL 2013. First records of *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) for east-central Canada. Can. Entomol. 145: 338-342.
- Queiroz-Santos L, Casagrande MM, Specht A 2018. Morphological characterization of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). Neotrop Entomol. 47: 517-542.
- Tiftikçi P, Komoşor S 2016. Çanakkale ili Sphingidae (Lepidoptera) türleri üzerinde faunastik araştırmalar. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi fen Bilimleri Dergisi 2(1): 58-67.
- Topakçı N, Yükselbaba U, Göçmen H 2019. Antalya ili yayla koşullarında örtü altında yetiştirilen hıyarlarda yeni bir zararlı: *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae)'in tanınması ve zararı. Mediterranean Agricultural Sciences 32(3): 1-7.



The synthesizing of defatted chia- chitosan beads for drug delivery

Beyza Arda, Simge Zengin, Burcu Okutucu* 

*Ege University, Faculty of Science, Biochemistry Department, Bornova, Izmir, TURKEY

*Corresponding author : burcu.okutucu@ege.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-0907-4175>

Received :05/02/2020
Accepted : 26/05/2020

Abstract: Chia (*Salvia hispanica L.*), Lamiaceae (Mint) family's long-year herbaceous, tropical and subtropical climates an angiosperm plant. The Chia seeds are a good source of fat, they contain protein, dietary fiber, minerals and polyphenolic compounds. After removing the oil, defatted chia seeds are mainly covered with a layer of muslin which consists of carbohydrates and protein. At optimal conditions, these seeds can be produced mucilages. These kind of mucilages are hydrophilic carbohydrate polymers of high molecular weights and consisted of many monosaccharide units joined by glucocidic bonds. Hydrophilic polymers are the most suitable materials for drug delivery systems. Chia seed mucilage has good water adsorption capacity, gel formation, emulsion stabilizing properties. Because of these structural and chemical properties, chia can be used in many areas such as; bakery compounds, nutritional supplement, thickener in food industry and coating materials as edible films. Also, natural mucilages like chia seed mucilage are biocompatible, cheap, easily available, low cost and lack of toxicity. In this study, we aimed to prepare the drug delivery material with defatted chia seed mucilage chitosan beads. The chia seed was defatted by Soxhlet extraction. To get best defatted the chia seed mucilage was incubated at different buffer (acetate, phosphate) and water at different ratios. After the defatted chia mucilage was ready, the different seed: buffer/ water ratio, pH and temperature were studied to get best form of beads for drug delivery. The water adsorption capacity and a model study for drug delivery with medicine was tested.

Keywords: Chia seed, drug delivery, natural mucilage, biopolymer

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Chia (*Salvia hispanica L.*), Lamiaceae (mint) family's long-year herbaceous, tropical and subtropical climates from the grain which is an angiosperm plant. Chia cultivation dates back to the pre-Columbus period. Today, annual production around the world is about 30,000 tons. *Salvia hispanica* produces white or purple flowers that grow significantly for seeds. The plant grows in numerous small brown, black and beige (without pigmentation) seeds, which are oval shaped. The seed consists 30 g fat/100 g seed weight and contains mostly unsaturated fatty acids. The composition of fat to total fat in chia seeds is α -linolenic acid (64%), linoleic (21%), oleic acid, stearic acid and palmitic acids. Chia seeds are also a good source of protein (19-27 g/ 100 g). Protein content (19-23%) in chia seeds is higher than most commonly used grains. Basic amino acids, such as leucine, isoleucine and valine, constitute 42.2 % of total amino acids in chia seeds. Another benefit of the chia seed is its high fiber content, which is 6% soluble. (Capitani et al., 2012; Porras-Loaiza et al., 2013).

The main physiological effect of chia fiber is to swell ability due to the presence of carbohydrates with hydrophilic bonds. This chemical structure is important for getting gel formation and therefore leads to an increase in the volume

of stool which induces more frequent peristaltic movements in the intestine. The carbohydrate composition of Chia seed gum was mainly of xylose, glucose and methyl glucuronic acid. Chia seeds polysaccharide (CSP), which is named as chia seed mucilage (CSM) as seen was the water soluble anionic hetero polysaccharide extracted from the seed layer (Dick et al., 2015; Xing et al., 2017).

Chia is used in many areas today. Chia fiber flour is used as a component in the bakery products and beverage industries because of its nutritious and functional properties. Chia seeds can be used in the production of bar, breakfast cereals and cookies in many countries as well as in nutritional supplements. There are many health-promoting properties of chia seed was known such as lowering blood sugar levels, controlling blood pressure, developing cardiovascular and colonial health, regulating intestinal emptying, and reducing gastro-esophageal reflux and heartburn. Chia seeds have potential as a functional ingredient to be used as a thickener in food and have been used to prepare blisters, coatings and edible films taken from the seed. In general, because of their water retention capabilities, it is widely used in different applications in the foods. The chia seed can also be used such as glue remover, gel builder and chelator. (Coorey et

al., 2014; Felisberto et al., 2015; Salgado-Cruz et al., 2013; Oliveira-Alves SC et al., 2017).

Chia seeds are good source of natural mucilage. The natural mucilage has excellent water retention properties, gel forming, cutting thinner and emulsion stabilizing properties, and they can be used as a functional additive for drinks. As a result of water retention capacity and viscosity, the chia mucilage can be used a foam stabilizer, suspension material, emulsifier in foods. The mucilage taken from chia seeds is a good source of polysaccharide based biopolymers and can produce edible films and coatings. The chemical composition, molecular structure and thermal stability or jellification ability of chia are important factors that determine the suitability of pits usage in the food and drug industry.

Given that the different conditions were occurred, polysaccharide mucilage are usually negatively charged in the wide pH range, while proteins are positively charged under their isoelectric point. The chia seed protein is positively charged under pH3. the Chia seed mucilage (CSM) is an anionic polysaccharide and negatively charged between pH 2.0-12.0. Under appropriate conditions, these counter-charged polymers in aqueous solutions interact with each other and form complex coacervated. (Timilsena et al., 2016a; Timilsena et al., 2016c; Sandavol-Oliveros et al., 2013).

The aim of the present study was to synthesize defatted chia seed chitosan beads and to identify its potential for the development of drug delivery material. By Soxhlet extraction, defatted chia seed was taken and after completely dried chia seeds was incubated in different buffer (phosphate, acetate) and water at different ratio, pH and temperature for obtaining the mucilage's of the bead which was used. The water adsorption capacity and a model study for drug delivery with medicine was tested.

2. Material and Method

2.1. Extraction of chia seed mucilage

Obtaining the chia mucilage two assay studied; defatting and mucilage extraction. The appreciate amount of chia seed (dry) were defatted to get chia seeds without oil content. Defatted chia seeds were taken after solvent extraction which were extracted with acetone in a Soxhlet by thermal cycles at 50°C for 5 hours. The excessed solvent was removed at 65°C for 3 days in incubator. The oil content was gravimetrically determined by this equation (dry weight/wet weight) (Timilsena et al., 2016d)

Mucilage extraction studied with defatted dry seeds. The mucilage extraction was performed with different seed: distilled water; buffer; temperature; ionic strength conditions (w/v). The selected temperatures were room temperature and 60°C and all the experiments were studied at these temperatures. The defatted chia seeds were (0.5 g) placed in tubes and distilled water was added in 1:20; 1:30; 1:50 proportions. The buffers were acetate (1M pH 4.5) and Pi (1 M pH 7) were chosen and studies as in described for distilled water (same proportions). To analyze the effect of ionic strength for mucilage extraction different sets for

chosen. The distilled water, Pi, acetate buffer containing 0.5 % NaCl and water, Pi and acetate KCl % 0.5 were studied. The same procedure was studied for all of these solutions (Campos et al., 2016; Munoz et al., 2012)

The distilled water, salt-free buffers and containing salt buffers (all proportions) were incubated at room temperature and at 60°C for 30 minutes. After incubation, the samples were centrifuged at 6000 rpm for 30 minutes. The aqueous phase was separated and mucilage was used as fresh.

2.2. Preparation of chia mucilage- chitosan beads (CM-CB)

Stock solution of chitosan was chosen 1 % (prepared with acetic acid). The various weight ratios (1:1; 1:1.5; 1:1.8) of the chia mucilage (all of the prepared which ones are; in distilled water, salt-free and salt-containing buffers) and chitosan solutions were mixed and stirred 30 min. The mixture was dropwise into the NaOH (5 M) and stirred till inclusion body (beads) observed at room temperature. The beads were observed nearly 10 min. after dropping to analyze if they dissolved or not.

2.3 The water adsorption capacity of chia mucilage- chitosan beads

The swelling behavior of CM-CB were determined under different conditions. The samples of 40 mg CM- CB were hydrated in 1 M of Pi (pH 7) and acetate buffer (pH 4.5) for 24 h. The experimental runs were performed in triplicate. After 24 h, each solution was centrifuged at 2000 rpm for 5 min and taken the weight of sample CM- CB. The average of water adsorption capacity was calculated by the percentage of dividing the difference of sample weight of CM-CB to original CM-CB weight to original CM- CB weight. The result was expressed as g water adsorbed per g bead (Timilsena et al, 2016b)

3. RESULTS

3.1. Defatted Chia Seed Beads

The reason why chia is used in our study is because of its chemical content. Chia seeds contain (15-29%) protein, (30-33%) fat, (26-41%) carbohydrates (40- 42 %), high dietary fiber. In the external part of the seed shell, the mucilage polysaccharides form 5% to 6% of the seed's dry weight. Early studies have shown that chia seeds are a good source of protein, fat and polysaccharides, and this feature provides them with excellent thermal stability and water retention capacity (Goh et al., 2016). Recently, the benefits of chia seed for human health and nutrition have been defined and bioactive components have been found to promote harm to health, improve biological markers associated with dyslipidemia, inflammation, cardiovascular disease, glucose homeostasis and insulin resistance, and have no adverse effect. Chia seeds have no known allergic and negative effect on the use of chia increases the area. Recent awareness of the health benefits of chia seed beads have led to an increase at academic research as a food additives and drug delivery. In this study, we prepared defatted chia seed

beads and optimized all conditions whether it can be a drug delivery material.

3.2. Optimization studies of CM-CB

The most important point was observing transparency chia seed beads. While defatting process, the outer shell of chia was removed by Soxhlet extraction (Timilsena et al., 2016d). The remain polysaccharide and protein skeleton has an ability of being gelling at different pHs and some solvents. In this study, we prepared buffers and salty buffers and brought together with defatted chia seeds and waited at room temperature and 60°C. According to media conditions gel was determined before pre-centrifuge and also after centrifuge. The observed gel was visible and no color (transparency). As known, the chia beads were in color from dark coffee to beige and soaked in water, a clear mucilaginous gel is exuded. In our study, we optimized

According table 1, at 60°C the getting chia beads were increased. The reason of this can be the protein structure of the chia beads. Because, the stability at high temperatures can be shown that hydrophobic bonds between the amino acids can be stabilized the polymer network at a high temperature (60 °C). According to Grancieri et al, the thermal stability of chia proteins was improved (108°C) when it interacted with chia seed mucilage by complex coacervation. We also found similar result. (Grancieri et al., 2019; Timilsena et al., 2016b)

conditions of getting more chia seed gel. All studies were carried out with defatted chia beads. After all, mucilage's were taken at room temperature and 60°C were mixed with chitosan as a crosslinker and dropwise in 5 M NaOH for getting defatted chia seed beads for drug delivery. The mucilage which were prepared at different solutions (water, buffer, buffers with salt) were also tested without chitosan for checking the bead observation was occurred or not. All of mucilage's, which were prepared at different ratio of seed: water/ buffers (phosphate and acetate)/ buffers with KCl/ NaCl, were observed but cannot be stabile beads without chitosan after dropwise in 5 M NaOH. Dark color mucilage was observed in acetate buffer. Because of this reason, the mucilage which were prepared in acetate buffer, did not use at further studies.

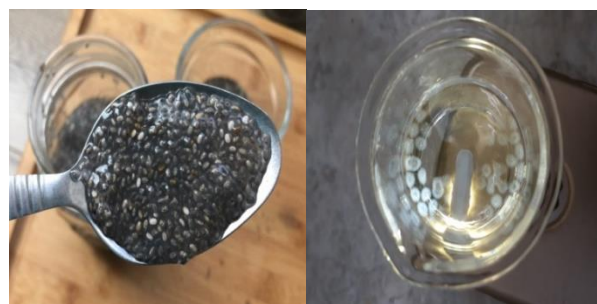


Figure 1. Chia seed and defatted chia seed: chitosan bead

Table 1. The optimization conditions of defatted chia mucilage- chitosan beads

Temperature	CM: chitosan (w/v)	P _i			P _i (NaCl)			P _i (KCl)		
		1:20	1:30	1:50	1:20	1:30	1:50	1:20	1:30	1:50
		Room temp	1:1.5	+	+	+	-	-	++	+
	1:1.8	+	++	+	+	+	++	+	+	+
60°C	1:1.5	++	-	+	++	-	++	-	+	+
	1:1.8	++	+	++	++	+	++	-	++	+

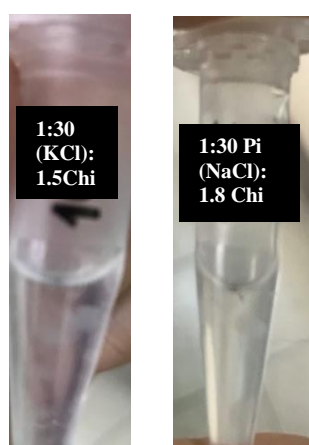
- : no bead formation

+ : observation bead formation but not very stable

++ : obtained very stable beads

Table 2. Water adsorption capacity of CM: CS

	(Seed: P _i): Chitosan	WAC (%)	(Seed: P _i (NaCl/ KCl): Chitosan	WAC (%)
Room temperature	(1:30):1.8	2.75	(1:30(NaCl)):1.8	1.13
	(1:50):1.8	3.50	(1:50(NaCl)):1.8	3.42
			(1:30(KCl)):1	0.96
			(1:30(KCl)):1.5	0.60
60°C	(1:20):1.5	3.15		
	(1:20):1.8	0.40		
	(1:30):1.5	5.23		
	(1:30):1.8	1.35		

**Figure 2.** The optimal defatted chia seed: chitosan beads

3.3 Water adsorption capacity (WAC)

The water adsorption capacity and fragmentation rate of the beads were determined by hydration in the buffers (Pi, acetate, buffers with NaCl/ KCl) and water (Table 2).

As known, chia seeds were hydrated very fast. But CM-CB was hydrated for a long time period. The polysaccharide skeleton of defatted chia seeds was incorporated with chitosan. By the effect of amino groups on the surface CM-CB were become more resistant to pH. The fragmentation or decrease on water adsorption capacity maybe the poor viscosity of CM-CB. The water adsorption capacity of the CM-CB was depending on the concentration and type of salt. The monovalent salts decrease in water holding capacity. Because salt concentration changed the osmotic pressure between the forming bead and watery phase. The presence of salts was the reason of loss of the hydrophilic and hydrophobic balance of beads polymer network. As known; the chia mucilage can absorb little or no water in the presence of ions. (Munoz et al., 2012) We also found same result. The beads were swollen easily when their polymer networks disrupted. The high-water capacity was desirable. This can be more useful while using drug delivery of these

CM-CB. They can be delivered the molecule easily to the media.

In this study, we choose a model drug to test defatted chia seed chitosan can be have a potential as drug delivery material. An herbal food supplement (proanthocyanin tablet) was crushed and dissolved in water (1mg/ ml). The beads which were prepared at 1 (1:30 P_i: KCl (mucilage)): 1.5 chitosan was used and incubated in Pi buffer (1M pH 7). As a result of time-dependent controlled delivery test; in 10 minutes 42 % and in 12 hours 100 % of drug was delivered to media.

4. Conclusion

The complex coacervation between defatted chia seed mucilage and chitosan was optimized in terms of pH, temperature, mucilage: chitosan ratio and salts. It was found that the complexation between defatted CM and chitosan was pH and the best CM: CS ratio was 1:30 at P_i: KCl (mucilage) to 1.5. The structural stability of CM:CS beads was much better compared to that of chia seed mucilage in NaOH after the complex coacervation. The water adsorption capacity of beads was shown that CM-CS system has irregular shape and porous microgel particles. The natural mucilages like chia seed mucilage are biocompatible, cheap, easily available, low cost and lack of toxicity. These results indicated that CM-CS beads can be used for encapsulation and delivery of molecules.

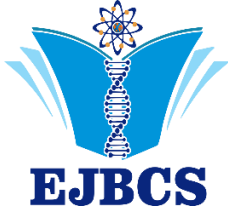
Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public or commercial.

References

- Campos BE, Ruivo TD, Scapim MRS, Madrona GS, Bergamasco RC 2016. Optimization of the mucilage extraction process from chia seeds and application in ice cream as a stabilizer and emulsifier. LWT- Food Sci Technol 65: 874-883.
- Capitani MI, Spotorno V, Nolasco S, Tomás MC 2012. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica L.*) seeds. LWT-Food Sci and Technol 45: 94-102.
- Coorey R, Tjoe A, Jayasena V 2014. Gelling properties of chia seed and flour. J Food Sci 79: 859-866.

- Dick M, Costa TMH, Gomaa A, Subirade M, Rios AO, Flôres SH 2015. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydr Polym* 130: 198-205
- Felisberto MHF, Wahanik AL, Gomes-Ruffi CR, Clerici MTPS, Chang YK, Steel CJ 2015. Use of chia (*Salvia hispanica L.*) mucilage gel to reduce fat in pound cakes. *LWT-Food Sci Technol* 63:1049-1055.
- Goh KKT, Matia-Merino L, Chiang JH, Quek R, Soh SJB, Lentle RG 2016. The physicochemical properties of chia seed polysaccharide and its microgel dispersion rheology. *Carbohydr Polym* 149:297-307.
- Grancieri M, Martino HSD, Mejia EG 2019. Chia seed (*Salvia hispanica L.*) as a source of proteins and bioactive peptides with health benefits: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18: 480-499.
- Muñoz LA, Cobos A, Diaz O, Aguilera JM 2012. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *J Food Eng* 108: 216-224.
- Oliveira-Alves SC, Vendramini-Costa DB, Cazarin CBB, Júnior MRM, Ferreira JPB, Silva AB, Prado MA, Bronze MR 2017. Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica L.*) seeds, fiber flour and oil. *Food Chem* 232: 295-305.
- Porras-Loaiza P, Jimenez-Munguia MT, Sosa-Morales ME, Palou E, Lopez-Malo A 2014. Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica L.*) seeds. *Int J Food Sci Tech* 49: 571-577.
- Salgado-Cruz MP, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez J, Farrera- Rebello R 2013. Chia (*Salvia hispanica L.*) seed mucilage release characterization: A microstructural and image analysis study. *Ind Crop Prod* 51: 453-462.
- Sandoval-Oliveros MR, Paredes-López O 2013. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica L.*). *J Agr Food Chem* 61: 193-201.
- Timilsena PY, Wang B, Adhikari R, Adhikari B 2016 a. Preparation and characterization of chia seed protein isolate chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloid* 52: 554-563.
- Timilsena Y, Adhikari R, Barrow C, Adhikari, B 2016b. Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chem* 212: 648-656.
- Timilsena YP, Adhikari R, Barrow CJ, Adhikari B 2016c. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *Int J Biol Macromol* 91: 347-357.
- Timilsena YP, Adhikari R, Kasapis S, Adhikari B 2016d. Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds. *Carbohydr Polym* 136:128-136.
- Xing X, Yves SY, Yap K, Ang ME, Lahnstein J, Tucker MR, Burton RA, Bulone V 2017. Isolation and structural elucidation by 2D NMR of planteose, a major oligosaccharide in the mucilage of chia (*Salvia hispanica L.*) seeds. *Carbohydr Polym* 175: 231-240.



Hatay İli Arsuz Bölgesi Topraklarının pH, Kireç, Organik Madde ve KDK İçeriklerinin Belirlenmesi

Rızkullah Cemil Gökpmar, Mehmet Yalçın*^{ID}

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Toprak Bölümü ve Bitki Besleme Bölümü, Hatay / Türkiye

*Correspondingauthor : myalcin@mku.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000/0002/1690/7681>

Received : 17/04/2020
Accepted :05/06/2020

Özet: Bu çalışmada Hatay ili Arsuz bölgesi topraklarının pH, kireç, organik madde ve katyon değişim kapasitesi (KDK) içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için bölge topraklarını temsil edecek şekilde 0-30 cm derinlikten ve 70 ayrı noktadan olmak üzere toplamda 70 adet toprak örneği alınmıştır. Örneklerde bölge topraklarının pH, kireç, organik madde ve KDK içerikleri belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre; toprakların pH içerikleri 7.65-8.42 arasında değişmekte olup, çalışma alanı toprak örneklerinin pH'larının tamamı hafif alkalin özellikte olduğu görülmüştür. Arsuz ilçesi topraklarının kireç içeriklerinin % 0.62-28.04 arasında olduğu ve kireç içeriklerinin çok az kireçli ile çok fazla kireçli arasında değişmekle birlikte, toprakların % 2.86'sı çok az kireçli, % 4.28'i az kireçli, % 48.57'si kireçli, % 38.58'zi fazla kireçli ve % 5.71'i ise çok fazla kireçli olarak belirlenmiştir. Çalışma alanı topraklarının organik madde içeriklerinin % 1.68-4.09 arasında olduğu ve toprak örneklerinin organik maddelerinin az ile yüksek değerler arasında değişmekle birlikte, toprakların % 14.28'i az, % 72.86'ı orta, % 11.43'ü iyi ve % 1.43'ü ise yüksek miktarda organik madde bulunmuştur. Çalışma alanı topraklarının KDK içerikleri 13.09-34.25 me/100 gr arasında değişmekle birlikte toprakların ortalama KDK içerikleri 22.57 me/100 gr olarak belirlenmiştir. Toprakların organik madde ile KDK içeriği arasında pozitif önemli ilişki belirlenmiş olup, diğer özellikler arasında ise önemli bir korelasyon ilişkisi belirlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: pH, Kireç, Organik Madde, KDK

Determination of pH, Lime, Organic Matter and CEC Contents of Soils of Arsuz Region, Hatay Province

Abstract: In this study, it was aimed to determine pH, lime, organic matter and cation exchange capacity (CEC) contents of Arsuz region of Hatay province. For this purpose, a total of 70 soil samples were taken from 0-30 cm depth at 70 different points to represent the soils of the region. In the samples, pH, lime, organic matter and CEC contents of the soils were determined. According to the results of the research, pH values of the soils vary between 7.65-8.42 and all of the soil samples have a slightly alkaline pH. Plus, the lime contents of Arsuz district soils are between 0.62-28.04%, varying between very little calcareous and very calcareous. In this regard, 2.86% of the soils are very little calcareous, 4.28% little calcareous, 48.57% calcareous, 38.58% very calcareous and 5.71% too much calcareous. In addition, the organic matter content of the study area soils was between 1.68-4.09%, varying between low and high values. In this respect, while low amount of organic matter was found in the 14.28% of the sample soils, moderate amount was found in the 72.86%, a good amount of organic matter was found in the 11.43% of the soils and a high amount of it was found in the 1.43% of the sample soils. What is more, CEC contents of the soils in the study area vary between 13.09-34.25 me / 100 gr, but the average CEC contents of the soils are determined as 22.57 me / 100 gr. A significant positive correlation was found between organic matter and CEC content of the soils, but no significant correlation was found among other properties.

Key Words: pH, Lime, Organic Matter, CEC

© EJBCS. All rights reserved.

Giriş

Toprakların mevcut özellikleri yanı sıra kimyasal özelliklerinin de bitkisel üretimde önemli bir faktör olduğu gerçeğini kabul etmek gerekmektedir. Bundan dolayıdır ki; toprakların kimyasal özelliklerinin korunması için gerekli önlemler alınmalıdır. Aksi bir durumda hızla artan nüfus karşısında bitkisel üretimin

kaynağı olan topraklardan beklenen yarar sağlanamayacaktır. Toprakların önemli kimyasal özelliklerinden olan pH, kireç ve organik madde içeriği bitkisel üretim açısından önemli fonksiyonlara sahiptir.

Topraklar, ana materyal olarak da bilinen kayalar ile organik materyallerin zaman içerisinde farklı şekillerde kimyasal, fiziksel ve biyolojik olayların etkisi ve çevresel

etkenleri ile ayrılarak ve parçalanarak oluşan doğal dinamik varlıklar olarak bilinmektedir (Esen 2019).

Tarım alanlarının tarımsal amaç dışında kullanılması sonucu yüksek oranda azalan alanlarda üretimin sürdürülebilir bir şekilde yapılabilmesi ve tarımsal bölgelerdeki topraklardan en az düzeyde yararlanılabilmesi için toprakların kimyasal ve fiziksel özelliklerinin çok iyi bir şekilde bilinmesi ve toprakların bu özellikleri karşısında daha uygun amenajman tedbirlerinin uygulanması gerekli hale gelmiştir (Turan ve ark. 2010).

Tarımsal amaçlı topraklarda organik maddenin genelde düşük olması, çevresel faktörlerden iklimin elverişliliği ve toprakların işlenmesi vasıtasıyla organik maddenin mineralize olması ve ekim sonrası ürün hasadı sırasında organik maddenin ortamdaki uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra sürdürülebilir tarımsal alanlarda ise uzun yıllar boyunca bitki artıklarının birikmesi, yaprak dökümü, organizma faaliyeti gibi nedenlerle organik madde sürekli takviye olmaktadır. Bir başka ifade ile tarımsal topraklarının kolay işlenebilmesi ve bu tür alanlarda yükseltinin düşük olması gibi sebeplerden dolayı tarım alanlarında bulunan organik madde ve humusun mineralizasyonunu hızlanmaktadır (Karagül, 1999).

Tarımsal çalışmalar sonucunda toprakların flora ve faunası değişmekle birlikte, hızla azalan toprak verimliliği, azalan toprak organik maddesi gibi nedenler toprakların fiziksel ve kimyasal yapısını bozmakta, aynı zamanda toprakların kirlenmesi ile erozyona neden olmaktadır. Bu sebepler nedeniyle çevresel koşullar hızlı bir şekilde bozulmaya uğrayarak ortamın hızla çöleşmeye başlaması, kalitesinin zarar görmesi ve toprak verimliliğinin devamlılığı giderek imkansız hale gelmektedir (Parlak ve ark. 2008).

Tarım topraklarında kireç içeriğinin yüksek olması özellikle toprakların çinko (Zn), demir (Fe), mangan (Mn) gibi besin elementlerinin topraktan bitkiler vasıtasıyla alınmasını olumsuz yönde etkiler. Toprak içerisinde kireç içeriğinin su ile teması sonucu karbonat, bikarbonat ve demir toprak çözeltisine elverişsiz hale geçer Aynı zamanda toprakların pH içeriği ise toprak içerisindeki bitki besin elementlerinin bitki tarafından alınması aşamasında oldukça önemli rol oynamaktadır. Toprak içerisinde besin elementleri genel olarak 6-7 pH aralığında bitkiler için daha elverişli olduğu söylenebilir (Uçgun ve Sezgin 2012).

Tarım topraklarının pH, kireç ve organik madde içerikleri ile benzer birçok çalışma yapılmıştır. Bunlardan Bilge ve Yalçın (2018) Hatay ili Kırıkhan-Reyhanlı bölgesi çayır - mera topraklarının pH, kireç ve organik madde içeriklerinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda; toprakların pH içeriklerinin 6.85-8.16 arasında değişmekte olduğu ve toprak örneklerinin pH'larının nötr ile hafif alkalın arasında değiştiği belirlenmiştir. Çayır mera topraklarının kireç içerikleri %

3.40-53.95 olup kireç içerikleri kireçli ile çok fazla kireçli arasında değişmekle birlikte, topraklarının organik madde içerikleri % 0.29-5.52 arasında olup toprak örneklerinin organik maddelerinin çok az ile yüksek arasında değiştiği belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada Yalçın ve Ağca (2005) Amik ovasında yer alan 29 toprak serisinde pH, kireç ve organik madde içeriğinin profildeki dağılımını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda; toprakların pH değerleri 7.21-8.42 arasında değişmekte olup, toprakların hafif ile kuvvetli alkalın reaksiyonlu olduğu ve toprakların kireç içeriklerinin % 1.40-70.30 arasında fazla kireçli topraklara sahip olduğu görülmüştür. Bu serilerde organik madde içerikleri % 0.10-22.04 arasında değişmekte olup toprak serilerinin genelinde organik madde içeriklerinin düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Mevcut araştırma kapsamında; Hatay ili Arsuz ilçesi tarım topraklarının pH, kireç, organik madde ve KDK içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler; bir yandan Arsuz ilçesi tarımsal amaçlı kullanılan toprakların oluşumu çalışmalarına temel verileri sağlayacak olup diğer yandan Arsuz ilçesi tarım topraklarının arazi kullanım planlamalarına ışık tutacak ve topraklarda bazı kimyasal sorunları ortaya çıkartacaktır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

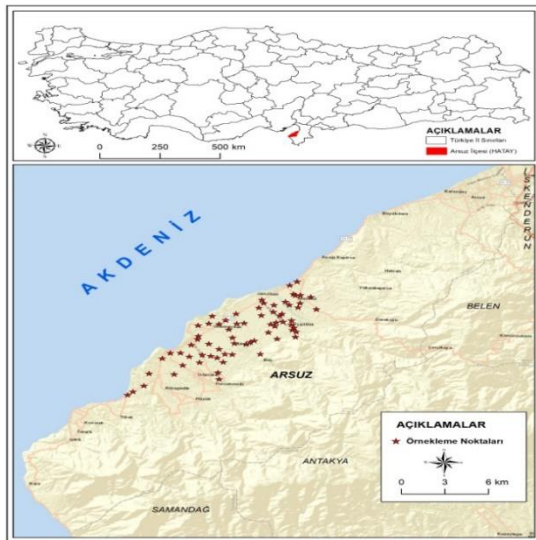
Çalışmada yöreyi temsil edecek şekilde Hatay ili Arsuz bölgesindeki köylerin tarım alanlarındaki 70 noktadan, 0-30 cm derinliğinden toplamda 70 toprak örneği usulüne uygun olarak alınmıştır (Şekil 1; Tablo 1). Aynı gün laboratuvara getirilen toprak örnekleri gölgede hava kurusu olacak biçimde kurutulmuş ve 2 mm'lik elekten geçirilerek analize hazır hale getirilmiştir.

Yöntem

Toprakların toplam çözünabilir tuz içerikleri saturasyon çamuru ekstraktında elektiriksel iletkenlik aletinde ve pH değerleri ise pH metre aletinde ölçülmüştür (Horneck ve ark. 1989), Kireç (CaCO₃) içerikleri Scheibler kalsimetresi ile (Allison ve Moode 1965), toprakların bünye sınıflarını belirlemek için hidrometre yöntemi ile GeeandBauder (1986), toprakların katyon değişim kapasitesini (KDK) belirlemek için Rhoades (1982) ve toprakların organik madde içerikleri Nelson ve Sommers (1989) tarafından bildirildiği şekilde modifiye edilmiş Walkley-Black yöntemiyle belirlenmiştir. Toprak özellikleri ile besin elementleri arasındaki korelasyon ve regresyon analizleri SPSS 17 istatistik programında yapılmıştır (Düzgüneş ve ark., 1987).

Tablo 1. Toprak örneklerinin alındığı yerler

Toprak No	Örnek Yeri	Toprak No	Örnek Yeri
1	Madenli-1	36	Akçalı-8
2	Madenli-2	37	Akçalı-9
3	Madenli-3	38	Akçalı-10
4	Madenli-4	39	Akçalı-11
5	Madenli-5	40	Akçalı-12
6	Madenli-6	41	Akçalı-13
7	Madenli 7	42	Akçalı-14
8	Madenli 8	43	Akçalı-15
9	Madenli 9	44	Akçalı-16
10	Madenli 10	45	Akçalı-17
11	Üçgüllük-1	46	Akçalı-18
12	Üçgüllük-2	47	Akçalı-19
13	Üçgüllük-3	48	Akçalı-20
14	Üçgüllük-4	49	Gökmeşdan-1
15	Üçgüllük-5	50	Gökmeşdan-2
16	Üçgüllük-6	51	Gökmeşdan-3
17	Üçgüllük-7	52	Gökmeşdan-4
18	Üçgüllük-8	53	Gökmeşdan-5
19	Üçgüllük-9	54	Çetellik-1
20	Üçgüllük-10	55	Çetellik-2
21	Üçgüllük-11	56	Çetellik-3
22	Üçgüllük-12	57	Çetellik-4
23	Üçgüllük-13	58	Çetellik-5
24	Üçgüllük-14	59	Çetellik-6
25	Üçgüllük-15	60	Çetellik-7
26	Üçgüllük-16	61	Çetellik-8
27	Üçgüllük-17	62	Çetellik-9
28	Üçgüllük-18	63	Çetellik-10
29	Akçalı-1	64	Çetellik-11
30	Akçalı-2	65	Çetellik-12
31	Akçalı-3	66	Çetellik-13
32	Akçalı-4	67	Çetellik-14
33	Akçalı-5	68	Çetellik-15
34	Akçalı-6	69	Çetellik-16
35	Akçalı-7	70	Çetellik-17

**Şekil 1.** Alınan Toprak Örneklerinin Arşuz İlçe Haritası Üzerindeki Gösterimi

BULGULAR VE TARTIŞMA

Toprakların pH, kireç, organik madde ve KDK durumları

Araştırmada kullanılan toprak özelliklerinin pH, kireç, organik madde ve KDK içeriklerine ait bulgular Tablo 2’de verilmiştir. Araştırma topraklarının pH içeriği örneklerde en düşük 7.65 iken, en yüksek pH içeriği 8.42 olarak belirlenmiştir. Çalışma alanı topraklarının ortalama pH içerikleri 8.06 olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinin pH içerikleri Eyüboğlu (1999)’nun verdiği sınır değerler göre çalışma alanı topraklarının tamamının hafif alkalin özellikte olduğu görülmüştür (Tablo 2). Çalışmada bulunan sonuçlar, bölge topraklarında çalışan Yalçın ve Ağca (2005)’nin Amik ovası topraklarında belirledikleri pH, kireç ve organik madde içerikleri ile uyumludur. Aynı bölgede yapılan benzer bir çalışmada Bilge ve Yalçın (2018) yaptıkları çalışmada toprakların pH içeriği bakımından benzer sonuçlar ortaya koymuşlardır.

Araştırma topraklarının kireç içeriği örneklerde en düşük % 0.62 iken, en yüksek kireç içeriği % 28.04 olarak belirlenmiştir. Toprakların ortalama olarak kireç içerikleri % 14.68 bulunmuştur. Toprak örneklerinin kireç içerikleri Ülgen ve Yurtsever (1988)'in vermiş olduğu sınır değerlere göre çok az kireçli ile çok fazla kireçli arasında değişmekle birlikte, toprakların %

2.86'sı çok az kireçli, % 4.28'i az kireçli, % 48.57'si kireçli, % 38.58'zi fazla kireçli ve % 5.71'i ise çok fazla kireçli görülmüştür (Tablo 2). Farklı bir bölgede yaptıkları çalışmada Yalçın ve Çimrin (2019) toprakların kireç içeriği açısından birbirine paralel sonuçlar ortaya koymuşlardır.

Tablo 2. Hatay ili Arsuz Bölgesi Topraklarının pH, Kireç, Organik Madde ve KDK İçerikleri

Toprak No	Derinlik	pH	Kireç (%)	O.M (%)	KDK me/100 gr	Bünye Sınıfı
1	0-30 cm	8.29	8.88	3.52	22.33	C
2	0-30 cm	8.28	16.98	2.47	25.70	SiC
3	0-30 cm	8.42	19.63	2.45	20.78	SiC
4	0-30 cm	8.15	26.32	2.87	29.44	C
5	0-30 cm	8.12	22.58	3.02	31.08	CL
6	0-30 cm	8.19	15.26	2.76	22.96	SiC
7	0-30 cm	8.28	12.15	2.79	21.62	SiC
8	0-30 cm	8.26	10.59	2.54	25.88	C
9	0-30 cm	8.16	2.65	2.51	25.05	SC
10	0-30 cm	8.24	10.75	2.80	24.34	C
11	0-30 cm	8.31	5.45	1.70	13.09	L
12	0-30 cm	8.26	17.76	3.08	16.60	SiCL
13	0-30 cm	8.22	14.17	2.58	19.98	C
14	0-30 cm	8.02	12.15	3.87	21.32	SiC
15	0-30 cm	7.96	13.08	1.97	21.11	SiC
16	0-30 cm	7.81	20.09	2.51	19.41	SiC
17	0-30 cm	8.05	14.33	2.38	19.81	SiC
18	0-30 cm	8.13	21.18	2.46	20.45	SiC
19	0-30 cm	8.12	21.49	1.85	24.75	SiC
20	0-30 cm	8.18	19.47	2.08	22.70	SiC
21	0-30 cm	8.15	14.33	2.20	27.67	C
22	0-30 cm	8.12	12.93	2.52	20.91	C
23	0-30 cm	8.21	22.58	1.68	24.89	C
24	0-30 cm	8.08	9.35	2.41	20.10	C
25	0-30 cm	8.22	16.98	2.17	18.52	SiC
26	0-30 cm	7.75	5.92	2.10	16.42	SiCL
27	0-30 cm	8.01	21.65	2.53	18.19	SiCL
28	0-30 cm	8.17	28.04	2.42	18.63	SiCL
29	0-30 cm	8.08	20.40	2.65	22.67	C
30	0-30 cm	8.16	27.26	2.23	21.36	SiC
31	0-30 cm	8.16	13.86	2.01	20.95	SiL
32	0-30 cm	8.17	10.59	1.89	18.55	CL
33	0-30 cm	8.13	18.69	1.74	20.53	SiC
34	0-30 cm	7.89	20.56	2.08	17.08	SiCL
35	0-30 cm	7.91	23.36	2.41	21.41	CL
36	0-30 cm	8.13	11.84	1.92	18.86	SiCL
37	0-30 cm	8.25	19.47	2.34	19.95	CL
38	0-30 cm	8.10	14.02	2.38	23.09	SiC
39	0-30 cm	8.12	13.71	2.41	21.92	C
40	0-30 cm	8.17	14.80	2.37	20.13	C

Tablo 2. (Devam)

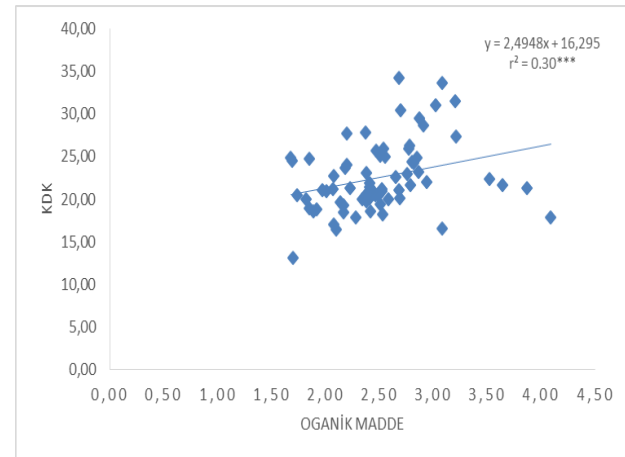
Toprak No	Derinlik	pH	Kireç (%)	O.M (%)	KDK me/100 gr	Bünye Sınıfı
41	0-30 cm	8.25	20.25	2.85	24.90	C
42	0-30 cm	8.04	18.07	1.82	19.97	C
43	0-30 cm	8.25	16.98	1.85	18.96	SiCL
44	0-30 cm	7.97	19.63	3.64	21.61	C
45	0-30 cm	8.02	13.55	2.28	17.87	CL
46	0-30 cm	7.95	13.24	2.52	21.22	C
47	0-30 cm	8.02	17.76	2.14	19.62	SiC
48	0-30 cm	8.03	14.49	2.69	20.17	C
49	0-30 cm	8.08	10.44	2.86	23.18	SiC
50	0-30 cm	8.06	10.75	2.94	22.06	SiC
51	0-30 cm	8.11	12.46	2.77	25.93	C
52	0-30 cm	8.05	10.59	2.17	19.32	SC
53	0-30 cm	8.08	10.12	2.70	30.49	C
54	0-30 cm	7.81	10.90	2.38	20.57	CL
55	0-30 cm	7.96	10.12	2.37	27.84	SiC
56	0-30 cm	7.70	16.98	2.07	21.15	SiCL
57	0-30 cm	8.14	10.12	2.20	24.06	C
58	0-30 cm	7.82	9.97	2.78	26.33	C
59	0-30 cm	8.09	17.91	2.49	20.42	C
60	0-30 cm	7.95	13.24	3.21	27.38	C
61	0-30 cm	7.84	3.74	1.69	24.57	CL
62	0-30 cm	7.87	0.93	3.20	31.56	C
63	0-30 cm	7.96	0.62	2.68	34.25	C
64	0-30 cm	7.98	12.77	3.08	33.70	C
65	0-30 cm	7.95	15.26	2.82	24.32	CL
66	0-30 cm	7.95	26.79	2.91	28.65	CL
67	0-30 cm	7.97	15.11	2.18	23.67	C
68	0-30 cm	7.77	16.04	2.55	25.01	C
69	0-30 cm	7.65	12.15	2.68	21.02	CL
70	0-30 cm	7.88	2.34	4.09	17.89	L
Min		7.65	0.62	1.68	13.09	
Max		8.42	28.04	4.09	34.25	
Ort. (Av.)		8.06	14.68	2.51	22.57	

Topraklarının organik madde içeriği örneklerde en düşük % 1.68 iken, en yüksek organik madde % 4.09 olarak belirlenmiştir. Toprakların ortalama organik madde miktarları % 2.51 bulunmuştur. Toprak örneklerinin organik maddeleri Güçdemir (2006)'ın verdiği sınır değerlere göre az ile yüksek arasında değişmekte olup, toprakların % 14.28'zi az, % 72.86'sı orta, % 11.43'ü iyi ve % 1.43'ü ise yüksek oranda organik madde görülmüştür (Tablo 2). Yalçın ve Ağca (2005)'nın Amik ovası topraklarında pH, kireç ve organik maddenin profildeki dağılımını belirledikleri çalışma sonuçları desteklemektedir. (Tablo 2). Toprakların KDK içerikleri 13.09-34.25 me/10 gr arasında olup ortalama KDK ise 22.57 me/100 gr olarak belirlenmiştir. Amik ovası topraklarının temel kimyasal ve fiziksel özelliklerini belirlenmesi isimli çalışmada Yalçın (2004) benzer sonuçları bildirmiştir.

Alınabilir Bor İçeriği ile Diğer Bazı Toprak Özellikleri Arasındaki İlişkiler

Araştırma konusu toprak özelliklerinden pH, kireç, organik madde ve KDK içerikleri arasındaki ilişkiler Tablo 3'de verilmiştir. Tablonun incelenmesinden de anlaşılacağı gibi toprakların organik madde ile KDK

değerleri arasında pozitif önemli ($r: 0.30^{***}$; Şekil 2) ilişki belirlenir iken diğer özellikleri arasında herhangi bir ilişkiye rastlanamamıştır. Karaduman ve Çimrin (2016). Gaziantep yöresi tarım topraklarının verimlilik durumlarını belirledikleri çalışmada toprakların organik madde ile KDK içeriği arasında pozitif önemli ilişki belirleyerek benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 2. Toprak örneklerinin organik madde ve KDK içerikleri arasındaki ilişki

Tablo 3. Hatay İli Arsuz Bölgesi Topraklarının pH, Kireç, Organik Madde ve KDK özellikleri arasında önemli bulunan korelasyon katsayıları

	pH	Kireç %	Organik Madde %	KDK me/100 gr
pH	1.00			
Kireç (%)	0.19	1.00		
Organik Madde (%)	-0.10	-0.15	1.00	
KDK me/100 gr	-0.09	-0.11	0.30***	1.00

*** 0.001 düzeyinde önemli

SONUÇ

Arsuz bölgesi topraklarının pH içerikleri 7.65-8.42 değerleri arasında değişirken toprakların ortalama pH içeriği ise 8.06 olarak belirlenmiştir. Araştırma konusu toprak serilerinin tamamında pH 8.42'nin altında olmasına rağmen, bazı topraklarda bu sınıra yakın değerler olduğu görülmektedir. Bu nedenle; pH'nın daha fazla yükselmemesi ve hatta bir miktar düşürülmesi için araştırma alanı topraklarında özellikle gübre uygulamalarında; amonyum sülfat gibi asit içerikli gübreler tercih edilmelidir. Toprakların kireç içerikleri % 0.62-28.04 arasında olup toprakların yaklaşık olarak % 90'nına yakını kireçli ve çok kireçli toprak sınıfına girmektedir. Aynı zamanda çalışma alanı topraklarının kireç içeriklerinin yüksek olması bu bölge toprakları açısından sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Çalışma alanı topraklarının organik madde içerikleri % 1.68-4.09 değerleri arasında olup toprakların genelinde düşük ve orta düzeyde organik madde hakim durumda bulunmuştur. Organik madde, çok çeşitli besin elementlerini içermesi ve gübre özelliğinin yanı sıra; toprakların fiziksel ve kimyasal özelliklerini de önemli ölçüde iyileştirmektedir. Koyu renkli olması nedeniyle; toprakların daha iyi ısınmasını ve daha çabuk tava gelmesini sağlamaktadır. Araştırma alanı topraklarının bazılarında organik madde içeriğinin düşük olması topraklarda havalanma, bozuk drenaj gibi sorunlar ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu nedenle; organik madde içeriği % 4 ten az olan örneklerin organik madde içeriği artırılmalıdır. Bunun içinde topraklara; çiftlik gübresi veya yeşil gübre uygulaması yapılmalıdır. Hatay ili Arsuz bölgesi topraklarında sonuç olarak pH açısından herhangi olumsuz bir durum bulunmaz iken organik madde ve kireç açısından problemler olduğu söylenebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Mehmet Yalçın'ın danışmanlığında yürütülen yüksek lisans çalışmasının bir bölümünden türetilmiştir. MKÜ BAP koordinatörlüğünün 19.YL.040 nolu projesi ile desteklenmiştir.

Referanslar

Allison LE, Moode CD 1965. Carbonate. (ed: C.A. Black). methods of soil analysis. Part 2. Agronomy Series. No. 9. ASA. 1379-1396. Wisconsin.

- Bilge MS, Yalçın M 2018. Hatay ili kırıkhan – reyhanlı bölgesi çayır-mera topraklarının pH, kireç ve organik madde içeriklerinin belirlenmesi. Imcofe V. International Multi Disciplinary Congress of Eurasia July 24-26, 2018 Barcelona/Spain, pp. 156-163.
- Düzgüneş O, Kesici T, Kavuncu O, Gürbüz F 1987. Araştırma deneme metotları (istatistik metotları-II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:1021. Ankara. 381s.
- Eyüboğlu F 1999. Türkiye topraklarının verimlilik durumu. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Yayınları, Genel yayın No: 220, Teknik Yayınlar No: T.67, Ankara.
- Esen M 2019. Toprak yıkama yöntemiyle Cd ve Pb ile kirlenmiş tarımsal toprakların iyileştirilmesi. Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı yüksek Lisans Tezi, p 77.
- Gee GW, Bauder JW 1986. Particle-size analysis. methods of soil analysis: part 1 physical and mineralogical methods, (methods of soil an1), Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, pp.383-411.
- Güçdemir İ 2006. Türkiye gübre ve gübreleme rehberi. TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, Genel yayın No: 231, Teknik Yayınlar No: T.69, Ankara.
- Horneck DA, Hart JM, Topper K, Koepsell B 1989. Methods of soil analysis used in the soil testing laboratory at Oregon State University. P 1-21. Agr. Exp. Sta. Oregon, USA.
- Karaduman A, Çimrin KM 2016. Gaziantep yöresi tarım topraklarının besin elementi durumları ve bunların bazı toprak özellikleri ile ilişkileri. KSÜ Doğa Bil. Derg., 19(2), 117-129.
- Karagül R 1999. Trabzon-Söğütödere havzasında farklı arazi kullanım şekilleri altındaki toprakların bazı özellikleri ve erozyon eğilimlerinin araştırılması. Tr. J. of Agriculture and Forestry, 23 (1999) 53-68.
- Nelson DW, Sommers LE 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter. in: sparks, d.l. (ed). Methods of Soil Analysis. Part 3, Chemical Methods, ASA and SSSA, Madison, WI, SSSA Book Series No: 5. 961-1010 pp.
- Parlak M, Fidan A, Kızılcık İ, Koparan H 2008. Eceabat ilçesi (Çanakkale) tarım topraklarının verimlilik durumlarının belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 14 (4) 394-400.
- Rhoades JD 1982. Cation exchange capacity. methods of soil analysis. Part 2, Second Edition American Society of Agronomy, Inc., USA pp 149-158.
- Turan MA, Katkat AV, Özsoy G, Taban S 2010. Bursa ili alüvyial tarım topraklarının verimlilik durumları ve potansiyel beslenme sorunlarının belirlenmesi. U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 24, Sayı 1, 115-130.
- Uçgun K, Sezgin S 2012. Isparta ilinde yoğun olarak elma yetiştirilen bölgelerin bazı toprak özellikleri. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi 26 (4): 42-49.

Ülgen N, Yurtsever N 1988. Türkiye gübre ve gübreleme rehberi (3. baskı). T.C. Tarım Orman Köy İşleri Bakanlığı, Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, Genel Yayın No: 151, Teknik Yayınlar No: T-59, Ankara. 182 s.

Yalçın M, Çimrin KM 2019. Boron content of wide soil groups of siverek (Şanlıurfa) region. Eurasian Journal of Forest Science, 7(2): 98-106.

Yalçın M 2004. Amik ovası topraklarının temel kimyasal ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 118 s.

Yalçın M, Ağca N 2005. Amik ovası topraklarında pH, kireç ve organik maddenin profildeki dağılımı. GAP IV. Tarım Kongresi 21-23 Eylül 2005 Şanlıurfa. 967-974 s

Synthesis of Bionanocomposite Films with PLA/Halloysite

Sevil Begüm Karakas¹ , Mehmet Burcin Piskin² , Nurcan Tugrul^{1*} 

¹Yildiz Technical University, Faculty of Chemistry and Metallurgy, Department of Chemical Engineering, Istanbul, Turkey

²Yildiz Technical University, Faculty of Chemistry and Metallurgy, Department of Bioengineering, Istanbul, Turkey

*Corresponding author : ntugrul@yildiz.edu.tr/ntugrul@hotmail.com

Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-1242-704X>

Received : 29/04/2020

Accepted : 05/06/2020

Abstract: Polylactic acid (PLA) is a kind of biodegradable and biocompatible polymer which can be replaced of other polymer groups based on petroleum. It is used in wider application areas such as packaging due to their unique properties. On the other hand, mechanical (brittleness) and thermal properties of PLA are inadequate so that it should be improved. Therefore, halloysite (HNTs) which is a kaolin group clay can be used to overcome from these obstacles due to their high mechanical strength and modulus. It is aimed to synthesize biocompatibility PLA/HNTs film and collaborate with plasticizer materials to improve mechanical properties of film. Moreover, it was examined effect of iron oxide proportion to features of film. PLA/natural HNTs films were prepared and plasticizer's material was mixed by solution casting method to investigate their tensile properties. In addition; HNTs sample which were taken from TURKEY contained iron impurities. Therefore, it was leached using by oxalic acid as a leaching agent. Fourier Transformed Infrared (FTIR), X-ray fluorescence (XRF) and X-ray diffraction (XRD) devices were used to characterization of HNTs clay. Additionally, the resultant films tensile properties were investigated. As a conclusion, it was observed that halloysite addition increased the tensile strength values of PLA/HNTs bionanocomposite films.

Keywords: Polylactic acid (PLA), halloysite (HNTs), solution casting method, leaching

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Using of non-biodegradable, petrochemical-based plastics materials have been led to environmental pollution. Therefore, it had been occurred requirement of finding alternative solution instead of using petrochemical-based plastics materials (Rhim et al. 2006). Tendency of using biodegradable plastics which are produced from renewable resource has increased (De Silva et al. 2014). In result of that enviromentally harmful effects had been reduced due to utilization of biopolymer such as polylactic acid (Alakrach et al. 2019). Polylactic acid which is an aliphatic polyesters is synthesized from lactic acid deriving from renewable sources (Murariu and Dubois 2016). Synthesis and recycle of PLA are illustrated in Fig 1.

PLA is undoubtedly one of the important materials for future applications owing of its self-properties. PLA has unique physico-chemical properties; low carbon foot print, high strength, oil resistance, acces of commercial easily and the ability to recycle lactic acid (Alakrach et al. 2018). It can be used for different application including of medical devices (bone surgery, chemotherapy etc.), engineering application (automotive, electronic and electrical devices

etc.), textile, composite materials and food packing (Alakrach et al. 2019; Rhim et al. 2006). However, usage of PLA is limited owing to their properties which are thermal, low mechanical and barrier so that it should be improved. Halloysite clay (HNTs) can be attractive candidate for enhancing these properties (Risyon et al. 2020).

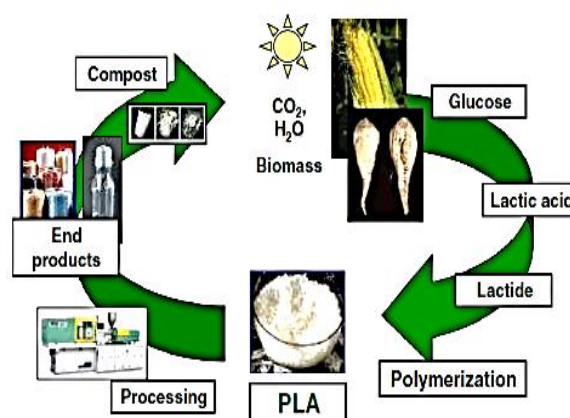


Fig 1. Synthesis and recycle life of PLA (Murariu and Dubois 2016).

HNTs which are aluminosilicate clay mineral is a sub-group of kaolin. HNTs empirical formula is $Al_2Si_2O_5(OH)_n$. Halloysite has distinctive properties such as nontoxic and biocompatible. Furthermore, HNTs have high cation capacity exchange so that it can exhibit good dispersion in PLA (Risyon et al. 2020). It has shown that quite important behavior for improving mechanical properties of PLA (De Silva et al. 2014; Risyon et al. 2020). HNTs incorporated into PLA biopolymer are shown in Fig 2.

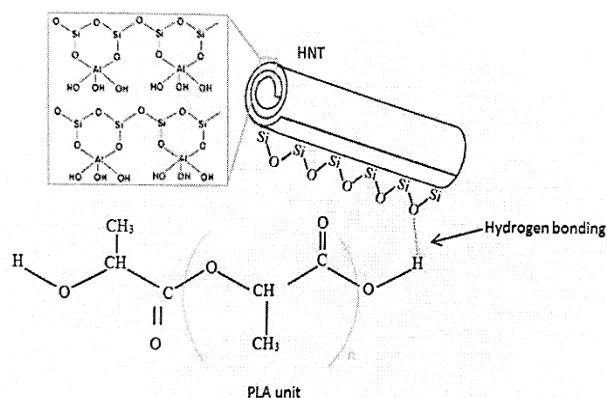


Fig 2. HNTs incorporation with PLA (De Silva et al. 2014)

Previous studies had shown that HNTs were affected for the improving mechanical properties of PLA. De Silva et al. (2014) synthesized PLA/HNTs bionanocomposite films including different concentrations of clay. Solution casting method was chosen to prepare the films. The films which were produced with 5 w/w % of HNTs had optimum results when compared with the other films results according to the tensile test (tensile modulus and strength) results. (De Silva et al. 2014).

In the present study, HNTs were leached for removing iron impurities and then were modified. In addition, HNTs were characterized using FT-IR, XRF and XRD. Furthermore, Solution casting method used to synthesis of PLA/HNTs bionanocomposite films and then their tensile properties were investigated.

2. Materials and Method

2.1. Materials

PLA was contributed by GEMApolimer. Density of PLA is 1.24g/cm^3 , glass transition temperature (T_g) is in the $60\text{ }^\circ\text{C}$ and melting temperature is $155\text{ }^\circ\text{C}$. Two HNTs types were supplied from different geological region, from Çanakkale, TURKEY. Chloroform, Hydrogen peroxide (H_2O_2 , 34-37%), Oxalic acid and NaOH were purchased from Merck. Polyethylen glycol (liquid state) was provided from Sigma Aldrich.

2.2. Purification of Clay

Iron-containing halloysite clay (HNT-1) were purified using leaching method. HNTs were dissolved into 1 M oxalic acid solution. The solution with solid/liquid ratio 1:10 (g/mL) was stirred at 300 rpm and $80\text{ }^\circ\text{C}$, for 2.5 h After this slurry was filtered with distilled water until pH 3 and then dried

24 h at room temperature (Calderon et al. 2005; Akçıl and Tuncuk 2006). Consequently, HNT-2 was obtained.

2.3. Modification of Clay

30 gram of halloysite clays; HNT-2 and HNT-3 (untreated the other clay); was stirred in 30% hydrogen peroxide aqueous solution for 1 h. This aqueous solution was dispersed using by sonication probe for 10 min and then was centrifuged at 5000 rpm for 15 min. Solid phases were separated and were dried two steps gradually which are happened at $110\text{ }^\circ\text{C}$ for 12 h in an oven and then at $60\text{ }^\circ\text{C}$ in a vacuum oven for 10 h. The final products of HNTs were treated by sodium hydroxide. HNTs were dissolved in distilled water and then NaOH was added, and then obtained solution was magnetically stirred for 24 h at room temperature. The solution was centrifuged and rinsed with distilled water until the pH 7. In the last step, the HNTs treated by NaOH. Drying procedure which was mentioned above was repeated for the solution. Consequently, HNT-4 and HNT-5 were obtained (Zeng et al. 2014).

2.4. Synthesis of Bionanocomposite Films with PLA/Halloysite

Solution casting method was chosen to synthesis PLA/Halloysite films with some modification combining two methods used (De Silva et al. 2014; Risyon et al. 2020). Both PLA and halloysite were dried at $60\text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h before preparing films. Then, 4.25 gram PLA was dissolved in 85 ml of chloroform for 3h at 500 rpm. The blends of PLA/HNTs film were occurred by adding 2.5 w/w % of HNTs to PLA solution. In addition, 0.5 gram Polyethylene glycol was added and the solution was stirred for 1 h at 760 rpm. Thus, the blend was sonicated by ultrasonic probe for 20 min at 45 % amplitude. The solution was then cooled for 10 min at room temperature and was poured into petri dishes (diameter, 20 cm). The cast solution was dried at $30\text{ }^\circ\text{C}$ for 72 h and then immersed in distilled water for 10 min before stripped from petri dishes. The previous steps were repeated with pure PLA (De Silva et al. 2014; Risyon et al. 2020).

2.5. Characterization

An infrared spectrum of halloysite which are untreated, leached and modified is characterized by using a Perkin Elmer Spectrum One Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer in the range of $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$.

The chemical analysis of halloysite which are untreated and leached was determined by X-ray Fluorescence (XRF) using a Panalytical MiniPA14 spectrometer.

XRD patterns of the untreated halloysite was determined by Philips Panalytical X'pert-Pro X-Ray diffractometer, using Cu K α radiation operated at 45 kV and 40 mA.

Tensile properties (tensile strength) of pure PLA and PLA/HNTs nanocomposite films were tested using universal testing machine (Zwick Z250Allround) based on

ASTM D882-18. 0.5 mm/s test speed was selected for entire tensile tests.

3. Results

3.1. FT-IR results

The obtained FT-IR absorption bands were given in Fig.3. The bands at 3695.61 and 3622.32 cm^{-1} corresponded to the characteristic O-H stretching of inner-surface and inner hydroxyl group. The band at 1645.28 cm^{-1} was attributed to H-O-H (adsorbed water) deformation. The O-H bending vibrations of the hydroxyl groups are observed at 908.47 cm^{-1} while the Si-O in plane stretching bands are observed at 1001.05 cm^{-1} . Also few functional peaks were observed at 1116.78 cm^{-1} as a perpendicular Si-O stretching, Al-OH vibrations of the surface hydroxyl groups are observed at 746.45 and 790.81 cm^{-1} (Saklar and Yorukoglu 2015; Saklar et al. 2012; Szczepanik et al. 2015).

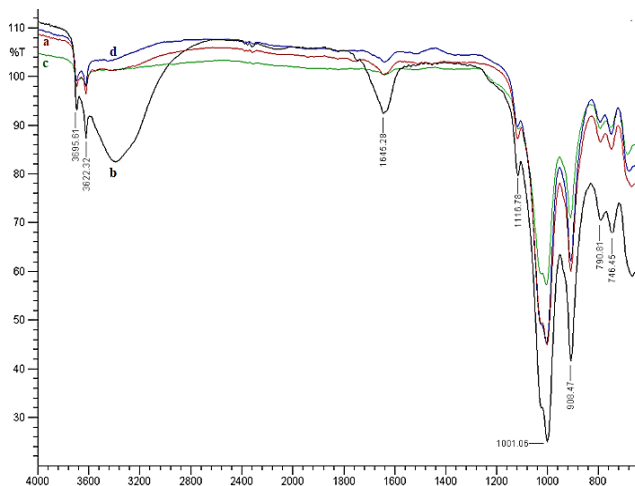


Figure 3. FT-IR spectrum of a) HNT-1, HNT-3 (untreated HNTs), b) HNT-2 (leached from HNT-1), c) HNT-4 (modified from HNT-2), d) HNT-5 (modified from HNT-3).

3.2. XRF results

The chemical analysis of halloysite was given in Table 1. The elemental composition was similar to the literature. Additionally, SiO₂ and Fe₂O₃ percentage has quite different between two untreated halloysite (HNT-1 and HNT-3) due to their region. Furthermore, XRF result of HNTs (HNT-2) showed that the leaching of HNTs (HNT-1) caused SiO₂, Al₂O₃ and Fe₂O₃ percentage decrease (Saklar and Yorukoglu 2015; Saklar et al. 2012).

3.3. XRD results

XRD pattern of halloysite which were untreated was illustrated in Fig.4. The XRD pattern of HNTs (HNT-1 and HNT-3) indicated the characteristic basal peaks of halloysite at 10 Å of halloysite. Furthermore, kaolinite also

appeared at 12,43°. The peaks of minerals were quartz, hematite, kaolinite and meta halloysite as regard pattern (Tchakouté et al. 2020; Saklar et al. 2012; Szczepanik et al. 2015).

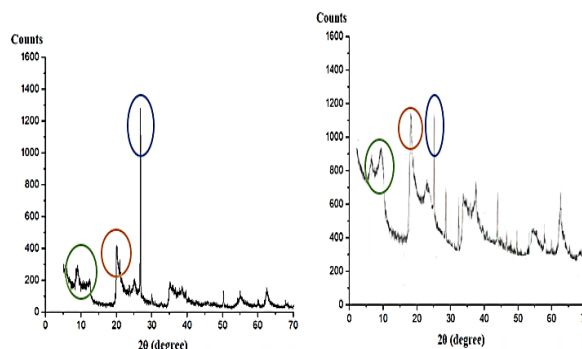


Figure 4. XRD patterns of untreated HNTs which were taken different region of TURKEY.

3.4. Tensile test results

Tensile strength test of pure PLA and PLA/ HNTs were given at Table 2. Tensile strength of all PLA/HNTs nanocomposites is higher than pure PLA. When compared two films which were prepared from halloysite, Tensile strength of PLA/HNT-5 (synthesis of HNT-5) is higher than PLA/HNT-4. This is because their iron oxide content is different. Moreover, HNT-5 has not been purified, just only modified from HNT-3 before starting to process of film so that it can be affected strength value.

Table 2. Tensile strength test result of neat PLA and 2.5 w/w % HNTs/PLA films

Materials	Tensile Strength MPa
Neat PLA Films	33.7
PLA/HNT-4	38.7
PLA/HNT-5	45.6

4. Discussion

In the present study, HNTs samples which were taken from TURKEY and contained iron impurities were leached using oxalic acid as a leaching agent. According to the XRF results, it was seen that, the iron oxide percentage: 61.62%, was reduced by leaching of HNT-1. Regarding to the FT-IR result, it can be said that HNTs had not been affected by the purification and modification procedures of clay. The tensile strength results of the films showed that halloysite addition increased successfully the strengths of film. The results are consistent with the literature.

Table 1. Chemical analysis of a) untreated HNTs (HNT-1), b) leached HNTs from HNT- 1 (HNT-2), c) untreated HNTs (HNT-3)

Materials	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	TiO ₂	K ₂ O	As ₂ O ₃	SO ₃	P ₂ O ₅	Na ₂ O	Cl ⁻	LOI
a	60,23	32,81	4,169	0,621	0,534	0,485	0,362	0,227	0,186	0,16	0,12	0,057	0,044
b	53,07	21,87	1,6	0,58	0,58	-	0,28	0,3	0,6	-	0,25	0,0191	14,59
c	42,8	38,81	0,88	0,08	0,16	-	0,01	-	-	1,31	0,04	-	15,65

5. Conclusion

In this study, the effects of iron oxide content on the bond structure of clay were investigated. The entire treatment procedure did not affect the structure of HNTs and was confirmed by the literature. It was also aimed to investigate the effects of two different types of HNT on the tensile strength properties of PLA. According to the results of our studies; it was observed that the tensile strength values of films which were synthesis from clay were similar to each other and the films which produced from pure PLA without clay additive had the lowest value as expected.

Acknowledgements

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

Authors' contributions: S.B.K., N.T. and M.B.P. contributed to the design and implementation of the research, to the analysis of the results and to the writing of the manuscript

Conflict of interest disclosure:

The authors have no conflict of interest to study.

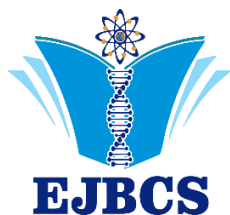
References

- Akçıl A, Tuncuk, A. 2006. Kaolenlerin safıslııtırılmasında kimyasal ve biyolojik yöntemlerin incelenmesi. *Kibited*. 2:59-69.
- Alakrach A M, Noriman N Z, Alsaadi M A, Sam S T, Pasbakhsh P, Dahham O S, Shayfull Z. 2018. Thermal properties of PLA/HNTs composites: Effect of different halloysite nanotube. In *AIP Conference Proceedings* 20(1):20052.
- Alakrach A M, Noriman N Z, Dahham O S, Al-Rashdi A A, Johari I, Razlan Z M, Khairunizam W. 2019. Physical properties of plasticized PLA/HNTs bionanocomposites: effects of plasticizer type and content. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 557(1):12067
- Calderon G D T, Rodriguez J I, Ortiz-Mendez U, Torres-Martinez L M. 2005. Iron leaching of a Mexican Clay of industrial interest by oxalic acid. *J Mater Online*. 1:1-8.
- De Silva R T, Pasbakhsh P, Goh K L, Chai S P, Chen J. 2014. Synthesis and characterisation of poly (lactic acid)/halloysite bionanocomposite films. *J Compos Mater*. 48(30): 3705-3717.
- Murariu M, Dubois P. 2016. PLA composites: From production to properties. *Adv Drug Deliv Rev*. 107:17-46.
- Rhim J W, Mohanty A K, Singh S P, Ng P K. 2006. Effect of the processing methods on the performance of polylactide films: Thermocompression versus solvent casting. *J Appl Polym Sci*.101(6): 3736-3742.
- Risyon N P, Othman S H, Basha R K, Talib R A. 2020. Characterization of polylactic acid/halloysite nanotubes bionanocomposite films for food packaging. *Food Packag. Shelf Life*. 23:100450.
- Saklar S, Yorukoglu A. 2015. Effects of acid leaching on halloysite. *Physicochem Probl of Mi Processing*. 51(1) :83-94.
- Saklar S, Ağrılı H, Zimitoğlu O, Başara B, Kaan U. 2012. Kuzeybatı Anadolu halloysit/kaolinitlerinin karakterizasyon çalışmaları. *MTA Genel Müdürlüğü Dergisi*. 145: 48-61.
- Szczepanik B, Słomkiewicz P, Garnuszek M, Czech K, Banaś D, Kubala-Kukuś A, Stabrawa I. 2015. The effect of chemical

modification on the physico-chemical characteristics of halloysite: FTIR, XRF, and XRD studies. *J Mol Struct*. 1084:16-22.

Tchakouté H K, Melele S J, Djamen A T, Kaze C R, Kamseu E, Nansu C N, Rüscher C H. 2020. Microstructural and mechanical properties of poly (sialate-siloxo) networks obtained using metakaolins from kaolin and halloysite as aluminosilicate sources: A comparative study *Appl Clay Sci*. 186:105448.

Zeng S, Reyes C, Liu J, Rodgers P A, Wentworth S H, Sun L. 2014. Facile hydroxylation of halloysite nanotubes for epoxy nanocomposite applications. *Polymer*. 55(25): 6519-6528.



Utilization of hydrothermal process water for microalgal growth

Seray Zora Tarhan¹, Anıl Tevfik Koçer¹, Didem Özçimen^{1*}, İskender Gökalp²

¹Yıldız Technical University, Faculty of Chemistry and Metallurgy, Department of Bioengineering, Istanbul, Turkey

²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), ICARE, Orleans, France

*Corresponding author : ozcimen@yildiz.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-2483-7617>

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

Abstract: Microalgae are one of the most effective biological sources for renewable energy production. They can be produced at rates that can be 50 times more than that of the conventional crops. They have a production capacity throughout the year. Comparing with other biomass sources such as terrestrial, agricultural and solid waste, algal biomass provides a more stable and manageable energy production system. However, there are some constraints for efficient microalgae production such as the need for large quantities of nutrients, high cost of installations and operation of production systems. For these reasons, using wastewaters obtained from different processes as a medium to grow microalgae has attracted new research interest. In the present study, the aqueous phase obtained from hydrothermal carbonization of orange pomace was utilized as a nutrient source in *Chlorella minutissima* growth. Different dilution rates (50x, 100x, 200x and 400x) were used to observe the effect of aqueous phase concentration on algal growth during 30 days. According to the results of microalgae cultivation, the medium with the lowest dilution rate was determined as the optimum medium because of giving the best growth value compared to other dilution rates.

Keywords: Microalgae, *Chlorella minutissima*, hydrothermal carbonization, HTC process water, algal cultivation

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Microalgae have extensive application potential in different areas such as nutraceutical industries, renewable energy, and biopharmaceutical and because of this potential, they are considered as important resources all around the world. Researchers investigate several microalgae species for their potential to produce specific value-added products that have remarkable biological and pharmacological qualities. Also, they have the specific ability for the conversion of atmospheric CO₂ to several products such as lipids, carbohydrates, protein, and different bioactive metabolites. Although microalgae usage in different application areas is a feasible way to obtain value-added products in the biopharmaceutical and bioenergy fields, researchers have identified some challenges and limitations that must be tackled to improve algal biotechnology systems for industrial application such as enhancing and stabilization of microalgae growth rate, efficient product synthesis, and pretreatment of biomass (Khan et al. 2018). To overcome these challenges and limitations, large scale microalgae cultivation must be provided by cost-effective systems and high-value products. According to the studies, different species of microalgae require different media depending on their needs but in general almost all species need major

requirements that are nitrogen, iron, phosphorous, inorganic and organic carbon sources for their growth (Grobbelaar et al. 2004). This situation is a key to provide a feasible, sustainable and economically viable algal biotechnology system with the help of successful cultivation processes for efficient algae production. Nowadays, pollution related problems originated from human being are the main concerns of the society. Especially pollution of freshwater is a huge problem to ensure the continuity of life. This problem motivates the researchers to investigate novel techniques to prevent pollution. As a result of the investigations, they realized that microalgae species provide an elegant way to solve water pollution problems with tertiary and quinary treatment methods because they have specific abilities to use inorganic nitrogen and phosphorous during their growth processes and also they can remove some toxic organic compounds and heavy metals without secondary pollution (Richmond et al. 1986; Oswald et al. 1988a; Tam et al. 1995; Rai et al. 1981). While the search for new sustainable and clean energy sources and wastewater treatment systems are continuing, society has recognized novel sustainable resources such the utilization of waste organic materials providing to reduce the potential risk and amount of greenhouse gas emissions (Hastings et

al. 2009; Hillier et al. 2009). As a result, hydrothermal processes have been accepted as environmentally friendly and economically viable methods. In 1913, Bergius discovered hydrothermal carbonization (HTC) that is a specific process mimicking the natural process of coal formation with the help of cellulose conversion into coal-like materials. During the HTC process, lignite-like solid products and an aqueous phase (AP) are obtained from a raw biomass material (Marinovic et al. 2015). At the beginning of the HTC studies, researchers focused on the solid product from treatment, but in recent years the unwanted liquid part has received increased attention because of its potential. Current studies showed that aqueous phase has nitrogen, high amounts of organic carbon and several toxic components such as cyclic oxygen and heavy metals. AP from HTC may support microorganisms and plant growth with several essential nutrients in its composition. If AP is utilized as the only nutrient source, the dilution rate of AP is important to provide efficient microalgae growth, while high AP dilution causes low nutrient concentration in the medium. Low AP dilution leads obviously to growth inhibition because of excessive toxic substances. With a suitable dilution rate, AP may be used as nutrition sources for algae. For example, *Chlorella vulgaris* were grown in AP from HTC of *Nannochloropsis oculata*. Growth rates in AP were determined higher than synthetic growth medium (BG-11) and no inhibition was observed (Du et al. 2012). Biller et al. (2012) reported that *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* and *Scenedesmus Dimorphous* were successfully cultivated in AP. HTC process water from activated sludge was also used as a media for *Chlorella sp.* and *Coelastrella sp.* and it was reported that growth rates in BG-11 and AP were similar and no inhibition in algae growth was observed (Belete et al. 2019). If the challenges and problems about safe disposal of AP in hydrothermal treatment and necessary nutrient requirements for mass microalgae cultivation are considered simultaneously, the utilization of the liquid phase from HTC for microalgal growth is an excellent idea. This process can provide a cost-effective close-loop system that includes the recovery of nutrients from waste AP from HTC and efficient microalgal growth with the help of these nutrients in an integrated system. The present study aimed to utilize the process water from HTC of orange pomace for efficient microalgal cultivation and high productivity rate and to treat HTC process water by using this cost-effective and environmentally friendly method. Firstly, HTC was performed for orange pomace and the obtained process water was characterized. Subsequently, unicellular marine algae "*Chlorella minutissima*" were cultivated in HTC process water diluted in different ratios. Finally, microalgae growth in AP, characterization of algae cultivated in synthetic medium and for various dilutions of the HTC process water were evaluated and discussed.

2. Materials and Method

2.1 Microalgae Culture and HTC Process Water

Wild type *Chlorella minutissima* obtained from the Culture Collection of Algae at Göttingen University (Goettingen, Germany) was used as the algal strain in this study. HTC

experiments with orange pomace (Valencia-Spain) were carried out in a 300 ml batch reactor (Top Industries, France) made of a nickel-base alloy (Inconel 718). For each experiment, 30 g of dried orange pomace and 180 g of distilled water were used as 1/6 of biomass to water weight ratio. HTC was conducted at 200 °C for 1 h (Ozcimen et al. 2019). Büchner filtration was used in the separation of solid and liquid products. The hydrochar product was dried in an oven at 105 °C for 24 h and stored for other studies. The liquid phase was weighed, stored and protected from light in a refrigerator at 4 °C until the use in this study.

2.2 Cultivation of Algae in AP from HTC

The algal strain was cultivated as 10% of microalgae to medium volume ratio in total 150 ml including BG-11 medium and 2 g/L glucose to provide enough starting cultures for this study. 50x, 100x, 200x and 400x dilution rates were used for AP medium and dilution of AP was performed with distilled water. BG-11 medium was used in the control group to understand the growth efficiency of *Chlorella minutissima* in the aqueous phase diluted in a different ratio. After the inoculation of microalgae, 250 ml Erlenmeyer flasks that include 150 ml autoclaved medium and *Chlorella minutissima* were incubated in an illuminated incubator–shaker at 150 rpm, 25 ± 3 °C under continuous cool-white fluorescent light (8000 lx) for 30 days. To observe algal growth simultaneously, samples were taken from the culture media day by day and algal growth was determined with optical density measurement at 680 nm (OD₆₈₀) using a UV-Vis spectrophotometer (PG Instruments T60V) and the growth rate was calculated from the following relationship: $GR = (\ln OD_t - \ln OD_0) / t$ where OD₀ is the optical density at the initial day, OD_t is the optical density measured on day t (Wang et al., 2010).

2.3 Characterization Analysis

After the 30 days cultivation period, algae were analyzed for the total carbohydrate, protein, lipid content and dry weight determination. Total carbohydrate, protein, and lipid content were determined with the phenol-sulfuric acid method (Dubois et al. 1965), modified Lowry method (Lowry et al. 1951) and modified Bligh and Dyer (1959) method, respectively. The functional groups of microalgae cultivated in different media were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) using FT-IR spectrometer (Bruker Alpha). Each spectrum was recorded in a wavenumber range from 4000 cm⁻¹ to 500 cm⁻¹. For the analysis of the aqueous phase, pH and electrical conductivity were measured by M1000 Benchtop pH and conductivity meters (labForce). The acidity value analysis of the process water was determined with a wet analysis method (ASTM D1067–16). Total organic carbon (TOC) was measured with a TOC analyzer (VarioTOC) with 0.2 mL injection volume and the aqueous phase was analyzed for chemical oxygen demand (COD) using COD Cell Test Tube C4/25 tube in S6 photometer (photoLab). Formic acid, lactic acid, acetic acid, hydroxymethylfurfural (HMF), and furfural analysis were conducted with HPLC (Spectra Physic).

3. Results and Discussion

3.1 Characterization of Hydrothermal Process Water

Hydrothermal carbonization of orange pomace was performed at 200°C for 1 h to analyze. The AP from HTC was used for algal cultivation. Lower temperature and shorter treatment time were applied to prevent the formation of toxic compounds limiting algal growth and loss of energy. To determine the most suitable dilution rate of AP for algal growth, AP was analyzed and physicochemical properties were revealed as it is seen in Table.1. The pH of AP from hydrothermal treatment may vary from 3.7 to 10.0 depending on biomass composition. In this study, this value was determined as 4.2. Its acidic structure and high carbohydrate/low protein content of biomass may lead to organic acid release to AP and also insufficient ammonia derived low protein content can be the reason of low pH of AP. Orange pomace is a complex source including pectins, carotenoids, polyphenols and flavonoids (Benelli et al. 2010) and it was reported that those compounds mostly dissociated at 175°C in water treatment (Hoshino et al. 2009; Wang et al. 2014; Wijngaard et al. 2012; Wijngaard and Brunton, 2009). Also, orange pomace consists of lignin in small quantities, cellulose, and hemicellulose. Hemicellulose decomposes at 180°C and affects AP composition. Total organic carbon (TOC) provides the determination of organic molecules or pollutants in the sample, chemical oxygen demand (COD) is the amount of oxygen needed for oxidizing all organic carbon completely and the COD value is used for the interpretation of inorganic material in the sample. In the study of Erdogan et al. (2015), TOC value was determined as 22.79 g/l and COD value was 0.90 g/l for orange pomace. For the HTC treatment performed at 175°C for 60 min, TOC and COD values were reported as ~25 g/l and ~65 g/l, respectively. For different treatments conducted at 190°C for 60 min, values were reported as ~22g/l and ~58g/l. TOC (22.79 g/l) was much more than COD value (0.90 g/l) and this shows that the amount of organic substances was higher compared with inorganic substances in AP. Generally, the carbon content calculated from the percentage of TOC is referred as the yield of AP, and high yield of AP was obtained from lignocellulosic biomasses (Panisko, Wietsma, and Lemmon et al. 2015) and food wastes (Maddi, Panisko, and Wietsma et al. 2017). Madsen et al. (2016) showed that decrease in the TOC values of AP from hydrothermal treatment was observed in the order of protein, carbohydrate and lipid, which means that TOC concentration of AP is mostly affected by the protein content of biomass. In our study, formic acid, lactic acid and acetic acid content of AP were analyzed using HPLC and determined as 2193.5, 1823 and 1646.5 ppm, respectively. According to studies of Erdogan et al. (2015) for HTC treatment performed at 175°C for 60 min, those values were reported as 0.9, 4.1, 1.7 g/l. For different treatments conducted at 190°C for 60 min, formic acid, lactic acid, acetic acid contents of AP were reported as 1.9, 5.2 and 2.5 g/l respectively. Short-chain organic acids such as acetate or acetic acid that are mainly formed with the decomposition of proteins and carbohydrates are mostly abundant organic acids in AP from hydrothermal treatment.

It is a known fact that acetate or acetic acid promotes mixotrophic growth rate of algae that increases recycling carbon and productivity as acting substrate (Bhatnagar et al. 2011). Also, the acid content in AP is affected by the decomposition of hemicellulose derivatives. 9.99% hemicellulose content in biomass reported by Rivas-Cantu et al. (2013) may have affected the AP content and increased the acid content and acidity (Li, Zhang, and Zhu et al. 2017). In our study, the concentration of HMF and furfural were also analyzed and found as 2617.9 and 794.7 ppm, respectively. In the study of Erdogan et al. (2015), the concentrations of HMF and furfural were reported as 312.1, 679.2 for HMF and 1585.2, 1180.1 for furfural ppm for two different temperature conditions (175 and 190°C). The degradation of polyphenol and organic acid derived from sugars leads to the formation of furfurals (Wijngaard and Brunton 2009). The concentration of HMF and furfural that was higher than 1 mM caused a decrease in the algal growth rate and the time needed to achieve maximum population density was prolonged. If those values were greater than 7 mM, complete inhibition was observed for algal growth due to direct inhibition of photosynthesis system. However no inhibitory effect was observed at concentrations lower than 1 mM (Yu et al. 1990). To decrease the inhibitory effect of these toxic compounds and observe the effect of nutrient concentrations on algal growth, different dilution rates (50x, 100x, 200x, 400x) were used in AP for the growth medium of algae.

Table 1. Physicochemical characteristics of AP from HTC

pH	Acidity	Conductivity (mS/cm)	TOC (g/l)	COD (g/l)	Formic acid (ppm)	Lactic acid (ppm)	Acetic acid (ppm)	HMF (ppm)	Furfural (ppm)
4.2	0.135	3.6	22.79	0.90	2193.5	1823	1646.5	2517.9	794.7

3.2 Algal Growth and Characterization of Algae

Algal growth in terms of optical density was observed during 30 days at 680 nm and the growth curve was plotted using these data as it is seen in Figure 1. *Chlorella minutissima* directly adapted to the diluted AP medium besides synthetic growth medium (BG-11). The shorter adaptation time provides a time-efficient growth process to obtain maximum population density in a short time interval. The growth rate of microalgae was calculated for different dilution rates and synthetic medium. For BG-11, 50x, 100x, 200x and 400x diluted AP, those values were determined as 0.0607, 0.054, 0.05, 0.047, 0.046 g l⁻¹ day⁻¹ and final biomass concentration were 1.313, 1.06, 0.887, 0.871 and 0.848 g/l; respectively. The growth rate of *Chlorella minutissima* in BG11 is compatible with the result of Jena et al. (2011). The high final biomass concentrations and productivity rate were observed with diluted AP medium. Among the four dilutions of the aqueous phase from HTC, both concentrations of final biomass and biomass productivity were in the following order: 50x > 100x > 200x > 400x. These results show that nutrient amount in AP decreased with the increasing dilution rate. In higher concentrations growth inhibition of toxic substances was not observed. However the maximum biomass productivity (0.054) among different dilutions was lower than synthetic medium with minor deviation. The most possible reason for

this decline may be the extremely low COD value of AP. As mentioned before, COD is an indirect measure of inorganic compounds in the sample. Especially in low concentrations of AP, COD was in extremely low concentration and this situation may have caused inorganic nutrient deficiencies in algae.

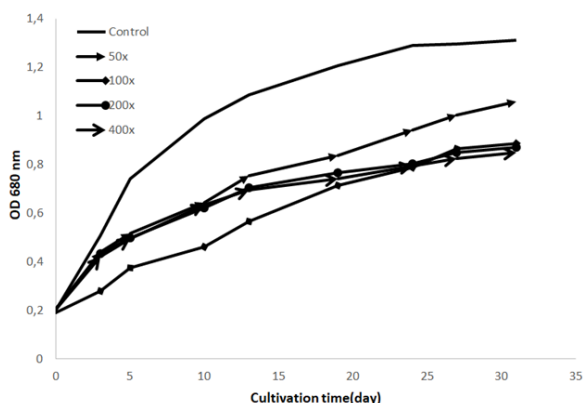


Figure 1. Algal growth curves in controlled media and different dilutions of AP

Dry weight, carbohydrate, protein and lipid contents of *Chlorella minutissima* cultivated in different dilution ratios and BG-11 medium were analyzed. Total carbohydrate, protein and lipid content based on dry weight are shown in Table 2. Among all nutrients accumulated in the algae structure, carbohydrate was detected with the highest amount. Microalgae may be used for different uses depending on their structural composition. Thus, it is very important to determine carbohydrate, protein and lipid contents of algae cultivated in AP from HTC. Also, analyzing the effect of different dilution rates of AP on the algal content is important to determine the efficiency of the AP medium. The lipid content of algae is an important parameter because it may be utilized in biodiesel production. It is seen in Table 2 that microalgae cultivated in all dilutions of AP had higher lipid content compared to that cultivated in BG-11. However, *Chlorella minutissima* grown in BG-11 had higher lipid content than the reported results (Sharma et al. 2016; Khan et al. 2018). The algal biomass after cultivation can be utilized as protein-rich high quality aquacultural or animal feed additives (Molino et al. 2018; Beneman et al. 2013).

Table 2. Dry weight, carbohydrate, protein and lipid content analysis of microalgae cultivated in BG-11 and different dilutions of AP

	BG-11	50X	100X	200X	400X
Dry weight (g/l)	0.345	0.279	0.233	0.229	0.223
Carbohydrate (%)	36.33	35.22	34.80	34.13	34.73
Protein (%)	33.08	32.56	33.14	32.32	31.80
Lipid (%)	23.19	25.13	23.60	24.06	24.68

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed in a wavenumber range from 4000 cm^{-1} to 500 cm^{-1} . FTIR spectra of microalgae cultivated in various dilutions of AP and BG-11 are shown in Figure 2 which shows that spectra for microalgae cultivated in AP and synthetic medium are similar.

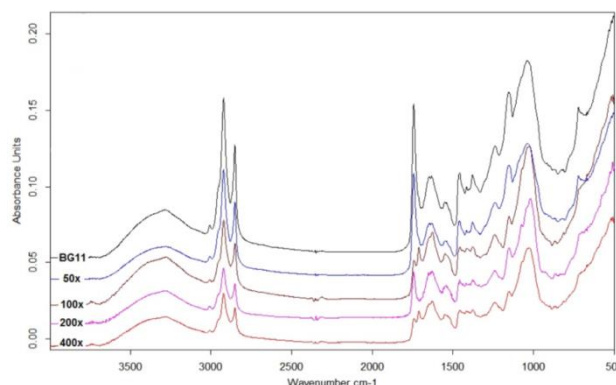


Figure 2. The FTIR spectra of microalgae cultivated in different media

The FTIR spectrum of *Chlorella minutissima* showed different characteristic peaks around 3300 cm^{-1} , 2900- 2800 cm^{-1} , 1750-1500 cm^{-1} and 1085-1050 cm^{-1} . The absorption at 3300 cm^{-1} can be assigned to the stretching vibrations of OH groups (Radhika and Mohaideen 2015) and derived moisture content of algae (Gibbons et al. 1968; Karbowiak et al. 2011). The weak peak around 2900-2800 cm^{-1} is typical for C-H stretching derived vibration of CH_2 . The peaks around 1750 cm^{-1} and 1085-1050 cm^{-1} are related with C=O and C-O stretching, respectively (Yang et al. 2015). According to Giordano et al. (2010) the typical band around 1750-1500 cm^{-1} can be assigned to lipids bands, 1160-1540 cm^{-1} were characteristics of proteins and the bands at 1085-1050 cm^{-1} were characteristics of carbohydrates.

5. Conclusion

The concentration of AP from HTC of orange pomace was optimized for higher productivity of *Chlorella minutissima*. The highest productivity was observed for 50x dilution of AP. Content analysis of microalgae cultivated in dilutions of AP and BG-11 showed that microalgae may be utilized for different usages such as agricultural, animal feed or biodiesel sources because of their high protein and lipid contents. These results proved that the aqueous phase obtained as a waste from the HTC process can be used in the cultivation of *Chlorella minutissima*. It is then demonstrated that the waste HTC liquid can be used as an alternative growth medium instead of using the high-cost media required for the production of algae. In addition, the HTC process water can be disposed with a cost-free and environmentally friendly method as well.

Acknowledgements

Anıl Tevfik Koçer and Seray Zora Tarhan were supported by TUBITAK BİDEB National Scholarship Program. Didem Özçimen was supported by the French Embassy in Turkey and the CNRS for her scholarship at ICARE-CNRS, Orléans.

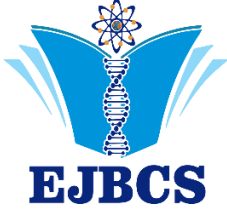
Conflict of interest disclosure:

There was no conflict of interest.

References

- Belete YZ, Leu S, Boussiba S, Zorin B, Posten C, Thomsen L, Wang S, Gross A, Bernstein R. 2019. Characterization and utilization of hydrothermal carbonization aqueous phase as nutrient source for microalgal growth. *Bioresour Technol.* 290: 121758.
- Benelli P, Riehl CAS, Jr AS, Smânia EFA, Ferreira SRS. 2010. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. *J Supercrit Fluids.* 55: 132–141.
- Benemann J. 2013. Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies.* 6: 5869–5886.
- Bhatnagar A, Chinnasamy S, Singh M, Das KC. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl Energy.* 88(10): 3425-3431.
- Biller P, Ross AB, Skill SC, Lea-Langton A, Balasundaram B, Hall C, Riley R, Llewellyn CA. 2012. Nutrient recycling of aqueous phase for microalgae cultivation from the hydrothermal liquefaction process. *Algal Res.* 1: 70–76
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37(8): 911-917.
- Du Z, Hu B, Shi A, Ma X, Cheng Y, Chen P, Liu Y, Lin X, Ruan R. 2012. Cultivation of a microalga *Chlorella vulgaris* using recycled aqueous phase nutrients from hydrothermal carbonization process. *Bioresour Technol.* 126: 354-357.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28: 350-356.
- Erdogan E, Atila B, Mumme J, Reza MT, Toptas A, Elibol M, Yanik J. 2015. Characterization of products from hydrothermal carbonization of orange pomace including anaerobic digestibility of process liquor. *Bioresour Technol.* 196: 35-42.
- Gibbons G, Goad L, Goodwin T. 1968. The identification of 28-isofucosterol in the marine green algae *Enteromorpha intestinalis* and *Ulva lactuca*. *Phytochemistry.* 7: 983–988.
- Giordano M, Kansiz M, Heraud P, Beardall J, Wood B, McNaughton D. 2001. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (bacillariophyceae). *J Phycol.* 37: 271–279
- Grobbelaar JU. 2004. Algal nutrition. In: Richmond A (ed) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.* Blackwell, Oxford, pp. 97–115.
- Hastings A, Clifton-Brown J, Wattenbach M, Mitchell CP, Stampfl P, Smith P. 2009. Future energy potential of Miscanthus in Europe. *GCB Bioenergy.* 1: 180–96.
- Hillier J, Whittaker C, Dailey G, Aylott M, Casella E, Richter GM, Riche A, Murphy R, Taylor G, Smith P. 2009. Greenhouse gas emissions from four bioenergy crops in England and Wales: integrating spatial estimates of yield and soil carbon balance in life cycle analyses. *GCB Bioenergy.* 1: 267–81.
- Hoshino M, Tanaka M, Terada A, Sasaki M, Goto M. 2009. Separation and Characterization of Pectin from Juice Processing Residue Extracted By Sub- Critical Water The 5th ISFR.
- Jena U, Vaidyanathan N, Chinnasamy S, Das KC. 2011. Evaluation of microalgae cultivation using recovered aqueous co-product from thermochemical liquefaction of algal biomass. *Bioresour Technol.* 102(3): 3380-3387.
- Karbowiak T, Ferret E, Debeaufort F, Andree V, Philippe C. 2011. Investigation of water transfer across thin layer biopolymer films by infrared spectroscopy. *J Membr Sci.* 370: 82–90.
- Khan SA, Malla FA, Malav LC, Gupta N, Kumar A. 2018. Potential of wastewater treating *Chlorella minutissima* for methane enrichment and CO₂ sequestration of biogas and producing lipids. *Energy.* 150: 153-163.
- Li K, Zhang L, Zhu L, Zhu X. 2017. Comparative study on pyrolysis of lignocellulosic and algal biomass using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Bioresour Technol.* 234: 48-52.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 (1): 265–275.
- Maddi B, Panisko E, Wietsma T, Lemmon T, Swita M, Albrecht K, Howe D. 2017. Quantitative characterization of aqueous byproducts from hydrothermal liquefaction of municipal wastes, food industry wastes, and biomass grown on waste. *ACS Sustain Chem Eng.* 5(3): 2205-2214.
- Madsen RB, Biller P, Jensen MM, Becker J, Iversen BB, Glasius M. 2016. Predicting the chemical composition of aqueous phase from hydrothermal liquefaction of model compounds and biomasses. *Energy & Fuels.* 30(12): 10470-10483.
- Marinovic A, Pileidis FD, Titirici MM. 2015. Hydrothermal carbonisation (HTC): history, state-of-the-art and chemistry. *Porous Carbon Materials from Sustainable Precursors*, 32th edn. Cambridge, UK
- Molino A, Iovine A, Casella P, Mehariya S, Chianese S, Cerbone A, Rimauro J, Musmarra D. 2018. Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *Int J Environ Res Public Health.* 15: 1–21.
- Oswald WJ. 1988. Large-scale algal culture systems (engineering aspects). In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds) *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 357–394.
- Ozcimen D, Missaoui A, Bostyn S, Belandria V, Gökalp I. 2019. Characterization of solid and aqueous phase products from hydrothermal carbonization of orange pomace. 2nd International Symposium on Hydrothermal Carbonization, Berlin, Germany.
- Panisko E, Wietsma T, Lemmon T, Albrecht K, Howe D. 2015. Characterization of the aqueous fractions from hydrotreatment and hydrothermal liquefaction of lignocellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy.* 74: 162-171.
- Radhika D, Mohaideen A. 2015. Fourier transform infrared analysis of *Ulva lactuca* and *Gracilaria corticata* and their effect on antibacterial activity. *Asian J Pharm Clin Res.* 8: 209–212.
- Rai LC, Gour JP, Kumar HD. 1981. Phycology and heavy metal pollution. *Biol Rev.* 56: 99–151.
- Richmond A. 1986. *Handbook of microalgal mass culture*, CRC Press, Florida, 528 pp.
- Rivas-Cantu RC, Jones KD, Mills PL. 2013. A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: technical advances and analysis of engineering challenges. *Waste Manage Res.* 31(4): 413-420.
- Sharma AK, Sahoo PK, Singhal S, Patel A. 2016. Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. *3 Biotech.* 6(2): 116.
- Tam NFY, Wong YS. 1995. *Wastewater treatment with microorganisms.* The commercial Press (H.K.) Ltd. 2D Finnie St. Quarry Bay, Hong Kong.
- Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Ruan R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol.* 162(4): 1174-1186.

- Wang X, Chen Q, Lü X. 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocoll.* 38: 129–137.
- Wijngaard H, Brunton N. 2009. The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *J Agric Food Chem.* 57: 10625–10631.
- Wijngaard H, Hossain MB, Rai DK, Brunton N. 2012. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res Int.* 46: 505–513.
- Yang J, Cao J, Xing G, Yuan H. 2015. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresour Technol.* 175: 537-544.
- Yu S, Forsberg Å, Kral K, Pedersén M. 1990. Furfural and Hydroxymethylfurfural inhibition of growth and photosynthesis in *Spirulina*. *Br Phycol J.* 25(2): 141-148.



Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

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



Kazdağları Bölgesine Ait Zeytin, Zeytin Yaprağı ve Zeytinyağlarının Element Tayini ve Metot Validasyonu

Serpil Kılıç^{1*} 

^{*1} Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO, Isparta, Türkiye

*Corresponding author :serpilkilic@isparta.edu.tr
Orcid No: https://orcid.org/0000-0002-4940-1839

Received : 19/05/2020
Accepted : 06/06/2020

Özet: Zeytin ağacı (*Olea europea*), ağır ve zahmetli büyümesine rağmen oldukça uzun ömürlüdür. Zeytinyağı, insan beslenmesi ve biyolojik değeri bakımından diğer tüm yemeklik yağlardan üstündür. Kazdağları ise Dünya'nın en lezzetli zeytinyağlarının üretildiği yerlerden biridir. Bu Bölgeye ait zeytin, zeytin yaprağı ve zeytinyağlarında metal konsantrasyonunun belirlenmesi insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada örneklerin çözünürleştirilmesinde mikrodalga sistemi, metal konsantrasyonlarının belirlenmesinde ICP-MS cihazı tercih edilmiştir. Metot validasyonu parametreleri LOD (tespit limiti), LOQ (tayin limiti), lineerlik, geri kazanım ve kesinlik olarak belirlenmiştir. Geri kazanım, bilinen miktarda NIST 1573 a Tomato Leaves ve LGC 7162 Strawberry Leaves sertifikalı referans maddeler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. % geri kazanım değerleri 99 ve 101 arasında değişmektedir. Numunelerde vanadyum (V), selenyum (Se), kobalt (Co), baryum (Ba), kurşun (Pb), arsenik (As), bakır (Cu), krom (Cr), çinko (Zn), mangan (Mn), demir (Fe) ve nikel (Ni) farklı konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen hiçbir örnekte kadmiyum (Cd) tespit edilmedi.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, metot validasyonu, zeytin, zeytinyağı

Determination of Element and Method Validation in Olive, Olive Leaf and Olive Oils of Kazdağları Region

Abstract: Olive tree, is very long lasting specie despite its heavy and troublesome growth. Olive oil is superior to all other edible oils in terms of human nutrition and biological value. Kazdağı is one of the places where the world's most delicious olive oils are produced. In this study, samples of olive, olive leaves and olive oils belonging to this region were analyzed for heavy metals which are very important for the human health. Microwave digestion system was used for the sample preparations and ICP-MS was preferred to determine metal concentrations. Method validation parameters were determined as LOD (detection limit), LOQ (quantification limit), linearity, recovery and precision. Recovery was achieved by using NIST 1573 a Tomato Leaves and LGC 7162 Strawberry Leaves certified reference materials. The recovery values changed between 99 and 101%. Concentrations of vanadium (V), selenium (Se), cobalt (Co), barium (Ba), lead (Pb), arsenic (As), copper (Cu), chrome (Cr), zinc (Zn), manganese (Mn), iron (Fe) and nickel (Ni) were measured at varying levels, however, cadmium (Cd) concentrations were below detection limit.

Keywords: Heavy metals, method validation, olive, olive oil

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Zeytin, besin içeriği açısından rengine göre çeşitli değişkenlik göstermektedir. Zeytinin kimyasal bileşiminin önemli bir kısmını su ve yağ oluşturur. Ayrıca bileşiminde protein, selüloz, yağ, fenolik bileşikler de yer almaktadır. Zeytinin bileşimini etkileyen faktörler, olgunluk derecesi, çeşidi ve yetiştirildiği bölgedir (Vinha ve ark. 2005). Ülkemizde özellikle Ege ve Akdeniz Bölgesinde zeytin yetiştiriciliği ve zeytinyağı üretimi oldukça yaygın hale gelmiştir. Zeytin üretiminde %77 sini karşılayan illerden

Aydın, Antalya, İzmir, Manisa, Muğla, Balıkesir, Bursa ve Çanakkale'dir (Oktav ve ark. 2003). Üretilen zeytinin %65-70'i yağlık geriye kalanı ise sofralık olarak tüketilmektedir (Mantzavinos ve Kalegerakis 2005). Zeytinyağı insan beslenmesinde oldukça önem arz etmektedir. Diğer yemeklik yağlara göre tercih edilmesinin başlıca sebepleri içeriğindeki yağ asit bileşimlerinin farklılığından kaynaklanmaktadır. Bu yağ asitlerinden oleik asidin kemik sağlığında önemli olduğu bildirilmiştir (Keçeli ve Turan Demirtaş 2008). Yine içeriğindeki fenol

bileşiklerinin farklılığı da bazı kanser hücrelerinin büyümesini önlediği ileri sürülmektedir. Zeytinyağı çıkarılması işlemi şöyledir: Üretilen zeytinler ezilerek hamur elde edilir, bu ezmenin ardından preslenme yapılarak ise yağ ile meyve suyu (kara su) ayrılır (Altan 1989). Böylece elde edilen yağ ise farklı işlemlere tabi tutularak naturel, rafine, riviera olmak üzere zeytinyağları üretilmiş olur (Anonymous 2007). Zeytinyağı tüketiminin bazı kanser türlerinin daha düşük oranda oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. Akdeniz diyetinin kansere karşı önemli koruyucu etkileri bulunduğunu gösterilmiştir (Oven ve ark. 2000).

Yapılan araştırmalarda bildirildiği gibi zeytin ve zeytinyağında element analizleri için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Ansari ve ark (2008), 16 farklı yağın kullanıldığı araştırmada tüm yağların Zn içeriği ve bazı türlerden elde edilen yağlarda ise yağın kalitesini, insan sağlığını olumsuz etkileyen atomik absorpsiyon spektrometresi ile Cd ve Pb tespit etmişlerdir. Yenilebilir yağlardan hurma ve zeytinyağında arsenik miktarının belirlenmesi amacıyla yapılan başka bir çalışmada atomik floresans spektrometresi kullanılmıştır (Chen ve ark. 2001). Benincasa ve arkadaşları (2007), İtalyadaki zeytinyağlarında element miktarlarını ve bu metal miktarlarına göre yetiştikleri coğrafi bölgelere göre yağların sınıflandırılması amacıyla yaptıkları çalışmada, Be, Mg, Ca, Sc, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, As, Se, Sr, Y, Cd, Sb, Sm, Eu, Gd tayini için ICP-MS kullanmışlardır. İndüktif Eşlenmiş Plazma-Kütle Spektrometre (ICP-MS) tekniği periyodik tablodaki pek çok elementi oldukça geniş bir aralıkta hızlı, kesin ve doğru olarak tanımlayabilmesi nedeni ile çoklu element tayini için en güçlü cihazı olduğu için tercih edilmiştir. Bu amaçla ICP-MS cihazı, tercih edilmiştir.

Çalışmada zeytin, zeytin yaprağı, yemeklik zeytin ve bu zeytinlerden soğuk sıkma yöntemiyle elde edilen zeytinyağları Balıkesir ilinin Akçay-Güre yerleşim bölgesindeki Kazdağları eteğine ve yol üzerinde bulunan zeytin bahçelerine aittir. Bu ürünlerin eser elementlerinin işlevleri ve etkileri göz önüne alındığında sağlık açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Bundan yola çıkılarak, metot validasyonu ile analiz metodunu güvenilirliği ortaya konmuş ve sonrasında numunelerdeki Zn, Mn, Fe, Cu, Co, Cd, Ba, Pb, As, Cu, Cr, Se miktar bakımından karşılaştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kimyasallar

Elementel analizlerde kullanılan mix standardı Perkin Elmer (ABD) firmasından, Suprapure® grade, %65'lik nitrik asit Merck (Germany) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan saf su için Millipore Elix 10 UV, Milli-Q Syntesis marka saf su sistemi kullanılmıştır.

2.2. Numunelerin toplanması

Olgunlaşmamış (yeşil) zeytin örnekleri, zeytin meyvesinin yeterince irileştiği ancak henüz siyahlanmadığı dönemde

yeşil zeytinlerden, örnek alma yöntemlerine uygun olarak (ağacın her tarafından olacak şekilde) örnekler elle toplanmış, etiketlenmiş ve falkon tüplere konularak laboratuara getirilmiştir. Olgunlaşmış (siyah) zeytin örnekleri, zeytin meyveleri yeterince siyahlandıktan sonra aynı zeytin ağaçlarından, örnek alma yöntemlerine uygun olarak (ağacın her tarafından olacak şekilde) örnekler elle toplanmış, etiketlenmiş ve falkon tüplere konularak laboratuara getirilmiştir. Yaprak numuneleri ise olgunlaşmış (siyah) zeytin örneklerinin alındığı sırada aynı ağaçlardan, dalında ve yere düşmüş yapraklardan örnekler alınmış, poşetlere konularak laboratuara getirilmiş, saf suyuyla yıkanan yapraklar üzerindeki saf suyu uzaklaştırmak için yaklaşık 30 °C'de etüvde kurutulduktan sonra analiz için saklanmıştır. Zeytinyağı ise toplanan zeytinlerin yağının (soğuk sıkım yöntemiyle elde edilen) çıkarıldığı fabrikadan alınmış, etiketlenmiş ve laboratuvara getirilerek +4 °C de buzdolabında saklanmıştır.

2.3. Örneklerin hazırlanması

Analiz için homojen hale getirilmiş olan tüm örnekler için yaklaşık 0.2 g tartılarak mikrodalga ünitesinin (Berghof Speedwave® Four Microwave System, Eningen, Almanya) teflon kapları içine konulmuş ve üzerine 6 mL HNO₃ ve 2 mL H₂O eklenmiştir. Mikrodalga ünitesinin sıcaklık koşulları, ilk önce 70 °C'den 170°C'ye 5 dakika, ardından 180°C'ye 15 dakika artış ve son olarak ise 70°C'de soğutma süresi 10 dakika şeklinde programlanarak numunelerin tamamen çözünür hale getirilmesi sağlanmıştır. Daha sonra örneklerin hacimleri ultra saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır (Kilic 2018). Hazırlanan numuneler Tablo 1'de çalışma şartlarına göre ICP-MS cihazında analiz edilmiştir.

2.4. Metot Validasyonu

Validasyon, bir yöntemin veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun nesnel olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanması işlemi olarak ifade edilmektedir (Araujo 2009). Metot validasyonu bir analiz metodunun doğru olarak uygulanabilmesini sağlamak, doğru olarak kullanıldığını belgelemek ve ölçüm sonuçlarının doğruluk ve kesinlik değerlerini ortaya koymak amacıyla yapılmaktadır (Taverniers ve ark. 2004). Metot validasyonu için sertifikalı referans madde olarak NIST 1573 a Tomato Leaves (As, Cd, Fe, Co, Cr, V, Cu, Mn, Ni and Zn için) ve LGC 7162 Strawberry Leaves (Pb ve Ba için) kullanılmıştır. Bu referans maddeler için örneklerde olduğu gibi yaklaşık 0.2 g alınmış, üzerine 6 mL HNO₃ ve 2 mL H₂O eklenerek mikrodalga ünitesinde yakma işleminden sonra son hacim saf su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Uygulanan yöntemin amaca uygunluğu kapsamında elementel analizleri için yöntemin doğrusal aralıkları, kalibrasyon denklemleri, kalibrasyon katsayıları, tespit ve tayin limitleri, tekrarlanabilirlikleri ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 1 ICP-MS çalışma koşulları

Spektrometre	Elan DRC-e (Perkin Elmer SCIEX, Norwalk, CT, USA)
Örnek girişi	Scott Spray Chamber
RF gücü	1000
Skimmer cone	Nikel
Sample cone	Nikel
Gaz akış oranı (L min ⁻¹)	Nebulizer gaz akışı: 0.91, Auxiliary gaz akışı:1.20, Plazma gaz akışı:18
Nebulizer	Meinhard TQ plus Quartz 0.5 ml
Tarama modu	Pik sekmesi
Analitik kütleler	Standart mod ⁷⁵ As, ²⁰⁸ Pb, ¹¹¹ Cd, ⁵⁹ Co, ⁵² Cr, ⁵¹ V, ¹³⁸ Ba, ⁵⁷ Fe, ⁶³ Cu, ⁵⁵ Mn, ⁶⁰ Ni, and ⁶⁶ Zn
Tarama okuma sayısı	20
Okuma tekrar sayısı	1
Tekrar sayısı	3
Oto örnekleme	CETAX ASX-520
Bekleme süresi	50
Örnek yıkama	Zaman (50), hız (+/- rpm)-48
Erteleme	Zaman (15), hız (+/- rpm)-20

2.4.1. Doğrusal aralık

Bu çalışma için 10 mg kg⁻¹ Perkin Elmer Multi element standardından 6 farklı (2, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg L⁻¹) konsantrasyon noktasında ve üç tekrarlı olmak üzere cihazlara enjekte edilmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

2.4.2. Kalibrasyon denklemi ve katsayısı

Doğrusal aralık çalışmasından elde edilen verilerin lineer regresyon analizi ile oluşturulan denklemini ifade etmektedir. Kalibrasyon katsayısı ise kalibrasyon denkleminin R² değerini ifade etmektedir.

2.4.3. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Tespit sınırı (LOD) bir analitik metot ile güvenilir olarak belirlenebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Kalibrasyon eğrisinin, eğimine (S) oranının 3 katı LOD değeri olarak kabul etmektedir. Tayin sınırı (LOQ), analitik metodun ölçebileceği en büyük değer olup, çok düşük konsantrasyonda analit eklenmiş örnek körünün standart sapmasının 10 katının ölçüm sınırı olarak belirlenmesi olarak belirlenmiştir (Traverniers ve ark. 2004).

2.4.4. Tekrarlanabilirlik

Geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri (%RSD) tekrarlanabilirlik değeri olarak ifade edilmiştir.

2.4.5. Geri kazanım

Bu kapsamda analitleri içeren standart çözelti geri kazanım çalışma örneklerine eklenerek en az 6 paralel örnek hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler üç kez cihaza verilmiş, elde edilen sonuçlardan da geri kazanım değerleri belirlenmiştir.

3. Tartışma ve Sonuç

3.1. Metot validasyon sonuçları

Numune çalışmalarına geçmeden önce yöntem doğrulama çalışmaları yapılmıştır. Bu çerçevede elementel bileşim analizleri için tespit ve tayin sınırı, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Kalibrasyon denkleminin R² değerini 0.9948-0.9999 aralığında değişim göstermiştir. LOD değerleri 0.1-2.5 (µg L⁻¹) aralığında; LOQ değerleri ise 0.3-8.2 (µg L⁻¹) aralığında tespit edilmiştir. Geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri (%RSD) tekrarlanabilirlik değeri olarak ifade edilmiştir. %RSD değerleri 0.1-0.6 aralığında değişim gösterirken, geri kazanım çalışması ise 99-101 aralığında bulunmuştur. Tablo 2 ve 3'te sunulan verilere göre kullanılan yöntemin doğrusallık, tekrarlanabilirlik, kesinlik bakımından element düzeyleri açısından yeterli düzeyde LOD ve LOQ düzeylerine sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 2. Çalışılan elementlerin metot validasyon sonuçları

Elementler	Kalibrasyon Denklemi	R ²	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)
As	y = 2507,2x - 3132	0.9997	1.1	1.8
Pb	y = 10934x - 360,1	0.9994	2.3	7.8
Cd	y = 2373,1x - 4144,5	0.9996	1.6	5.3
Ba	y = 15610x + 203286	0.9948	1.6	5.2
Fe	y = 438,39x - 2566,8	0.9999	1.4	4.7
Co	y = 16293x - 9831,2	0.9999	1.5	5.0
Cr	y = 12961x - 5610,6	0.9999	1.6	5.5
V	y = 15181x - 9469,6	0.9999	2.5	8.2
Cu	y = 8758,1x - 17831	0.9998	0.1	0.3
Mn	y = 19325x - 25660	0.9998	1.6	5.4
Ni	y = 3819,1x - 5674,5	0.9999	2.4	8.1
Zn	y = 2442x - 2638,9	0.9993	0.5	1.8

Tablo 3. Çalışılan elementlerin geri kazanım sonuçları

Elementler	Sertifika Değeri	Bulunan Değer	Geri Kazanım	%RSD
As	112±4.0	111±0.4	99	0.3
Pb	1800±400	1797±0.8	100	0.1
Cd	1520±40	1520±0.5	100	0.1
Ba	107±10	107±0.5	100	0.5
Fe	368±7.0	367±1.1	100	0.3
Co	570±20	572±0.5	100	0.1
Cr	1990±60	1989±0.6	100	0.1
V	835±10	835±0.8	100	0.1
Cu	4.7±0.14	4.7±0.03	101	0.6
Mn	246±8.0	246±0.5	100	0.2
Ni	1590±70	1592±1.0	100	0.1
Zn	31±0.7	31±0.2	101	0.6

dipnot; Ba, Fe, Zn, Cu, Pb ve Mn için sertifika ve bulunan değerler mg L⁻¹; As, Cd, Co, Cr, V, Ni, µg L⁻¹ olarak verilmiştir.

3.2. Numune Sonuçları

Periyodik tabloda bulunan 105 elementin 80'nini metaller oluşturmaktadır. Esansiyel olanlar, eksikliklerinde olduğu gibi fazla miktarlarda alındıklarında da vücut homeostazını bozarak toksik etki oluşturabilirler. Endüstriyel metaller olarak nitelendirilen metal ve alaşımı tıpta ve veteriner hekimlikte ilaç, pestisit olarak kullanılmaktadır. Doğal kaynaklar ve teknoloji ile kirlenen toprakta yetişen bitkilerde metal birikimi olabilir. Diğer taraftan fosil

kaynaklı yakıtların içerdiği arsenik, kurşun, kadmiyum, selenyum, vanadyum gibi metaller çevremizdeki havayı kirleterek, metabolizmaya alınabilir (Çevik Yılmaz 2015). Tüm bu etkileşimler göz önüne alınarak yapılan çalışmamızda zeytin, zeytin yaprağı ve zeytinyağlarının elementel bileşim analizine ait sonuçlar Tablo 4 ve Şekil 1'de görülmektedir.

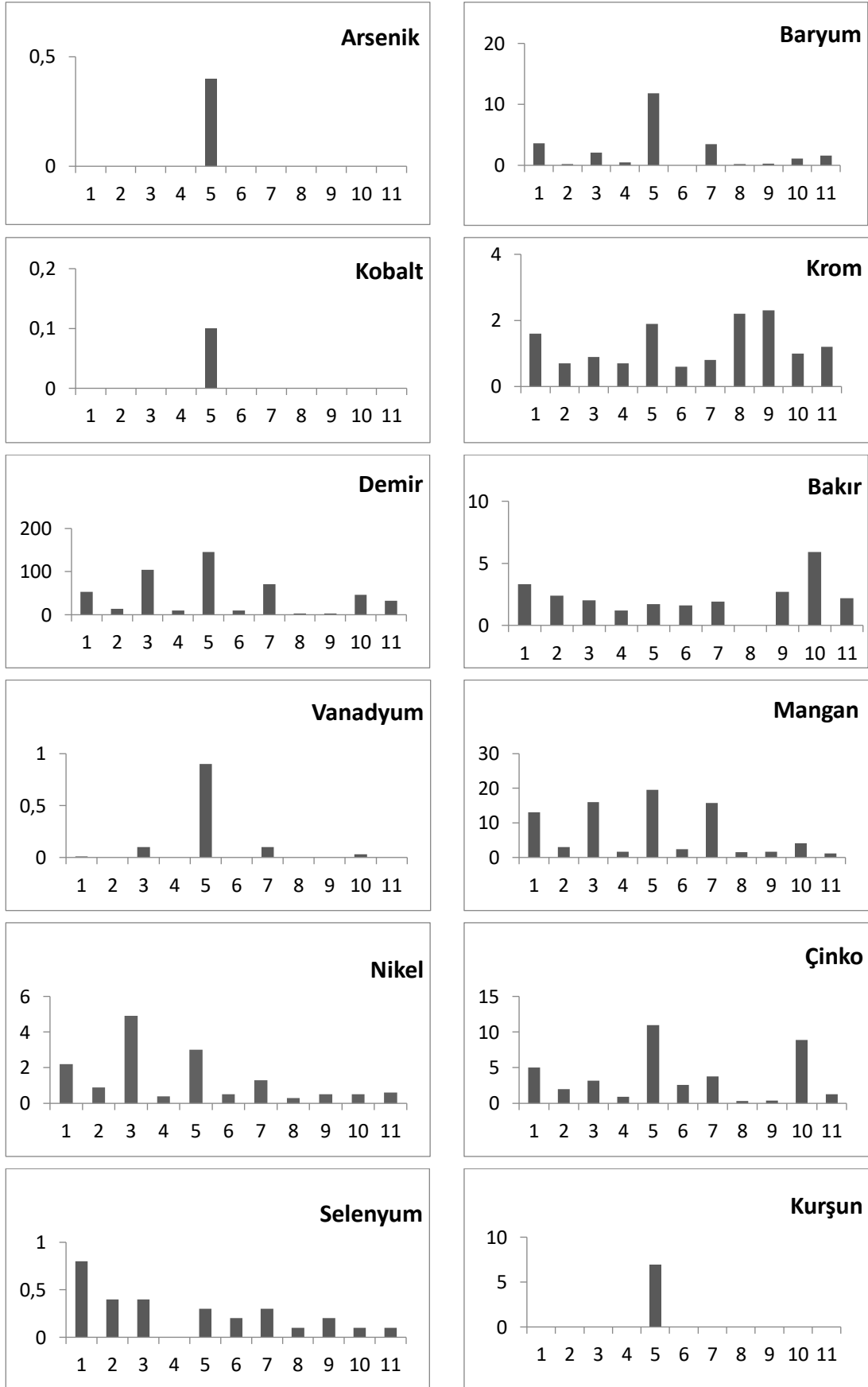
Tablo 4. Numunelerin element içeriği (mg L⁻¹)

Numuneler	As	Ba	Cd	Co	Cr	Fe	Cu	V	Mn	Ni	Zn	Se	Pb
1.Kazdağı yeşil zeytin yaprağı	<LOD	3.6	<LOD	<LOD	1.6	52.8	3.3	0.01	13.0	2.2	5.0	0.8	<LOD
2.Kazdağı yeşil zeytin	<LOD	0.2	<LOD	<LOD	0.7	13.8	2.4	<LOD	3.0	0.9	2.0	0.4	<LOD
3.Yol kenarı yeşil zeytin	<LOD	0.5	<LOD	<LOD	0.7	9.6	1.2	<LOD	1.7	0.4	0.9	<LOD	<LOD
4.Yol kenarı yeşil zeytin yaprağı	0.4	11.8	<LOD	0.1	1.9	145.6	1.7	0.90	19.6	3.0	11.0	0.3	7.0
5.Kazdağı siyah zeytin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.6	10.2	1.6	<LOD	2.4	0.5	2.6	0.2	<LOD
6.Kazdağı siyah zeytin yaprağı	<LOD	3.5	<LOD	<LOD	0.8	70.5	1.9	0.10	15.7	1.3	3.8	0.3	<LOD
7.Soğuk sıkım zeytinyağı	<LOD	0.2	<LOD	<LOD	2.2	2.8	<LOD	<LOD	1.5	0.3	0.3	0.1	<LOD
8.Soğuk sıkım zeytinyağı	<LOD	0.3	<LOD	<LOD	2.3	2.9	2.7	<LOD	1.6	0.5	0.4	0.2	<LOD
9.Yemeklik siyah zeytin	<LOD	1.1	<LOD	<LOD	1.0	46.1	5.9	0.03	4.1	0.5	8.9	0.1	<LOD
10.Yemeklik yeşil zeytin	<LOD	1.6	<LOD	<LOD	1.2	32.3	2.2	<LOD	1.2	0.6	1.3	0.1	<LOD

Sonuçlara bakıldığında kadmiyum hiçbir numunede tespit edilmezken arsenik, kobalt ve kurşun sadece yol kenarında bulunan yeşil zeytin yaprağında tespit edilmiştir. Burada yüksek oranda kirlilik olmasının sebebi asfalt kenarı olduğu için buradan çok sayıda geçen arabalardan çıkan egzoz gazları, trafiğin yoğunluğundan kaynaklı toz bulutları gibi sorunlar olduğu düşünülmektedir. Baryumun, araçlarda fren balataları altlığında kullanıldığı bildirilmektedir (DPT 2001b). Bu balata aşınmasından ve dizel yakıtlarda da duman azaltıcı olarak kullanıldığından bu egzozdan dışarı atılmasına sebep olmaktadır. Baryum elementi en yüksek yol kenarında bulunan yeşil zeytin yaprağında tespit edilmesi bunun bir göstergesi olduğunu düşündürmektedir. Krom en yüksek soğuk sıkım zeytinyağında tespit edilirken, en düşük Kazdağı siyah zeytinde olduğu görülmüştür. Demir yine en yüksek yol kenarında bulunan yeşil zeytin yaprağında bulunurken, en az soğuk sıkım zeytinyağında tespit edilmiştir. Bakır soğuk sıkım zeytinyağında tespit edilmezken en çok yemeklik siyah zeytinde olduğu görülmüştür. Vanadyum <LOD - 0.9 mg L⁻¹, selenyum ise <LOD-0.8 mg L⁻¹ aralığında tespit edilmiştir. Mangan yemeklik zeytinde 1.2 mg L⁻¹ iken yol kenarında bulunan yeşil zeytin yaprağında 19.6 mg L⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Yemeklik siyah zeytinde demir ve çinko değerleri yeşil zeytine göre daha yüksek

olduğu sonucuna varılmıştır. Nikel ve çinko soğuk sıkım zeytinyağında en az iken yol kenarında bulunan yeşil zeytin yaprağında en fazla olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde kirliliği numunede baryum, vanadyum, nikel, mangan, element miktarları da diğer numunelere göre daha yüksek bulunmasının sebebi trafiğin yoğunluğundan kaynaklı toz bulutlarından kaynaklandığı düşüncesine varılmıştır. Literatürlere gördüğümüz kadarıyla bu yöreye ait bu şekilde ağaçtan sofraya yönelik çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak Yatağan bölgesine ait bir çalışmada siyah ve yeşil zeytin örneklerinde kurşun ve kadmiyum elementleri tespit edilirken, bizim numunelerimizde bu elementlere tespit edilmemiştir (Çevik Yılmaz 2015).

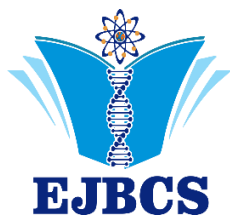
Bu amaçla, ağacın dalında yeşil zeytinle başlayan yolculuk, lezzet ve sağlık kaynağı olarak sofralarımıza gelen sofralarda yerini alan zeytin ve zeytinyağlarının oksijen bakımından oldukça zengin Kazdağları Bölgesi tercih edilmiştir. Bu bölgeye ait zeytin, zeytin yaprağı ve zeytinyağı ile element bileşim içeriği karşılaştırması yapılmıştır. Çünkü bu insan sağlığı açısından taşıdığı önem konusunda zeytin ve zeytinyağı sektörünün bilinçlendirilmesi ve tüketicilerin daha sağlıklı beslenmesi açısından önem arz etmektedir.



Şekil 1. Çalışılan elementlerin örneklerdeki konsantrasyon (mg L⁻¹) dağılımı

Kaynaklar

- Altan A. 1989. Yemelik Yağ Teknolojisi Ders Notları. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana.
- Anonymous 2007. Türk Gıda Kodeksi, Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği (Tebliğ No: 2007/36). <http://www.kkgm.gov.tr>, Erişim Tarihi: 18.09.2014.
- Ansari, R., Kazi, T., Jamali, M., Arain, M., Wagan, M., Jalbani, N., Afridi, N., Shah, A. 2008. Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. *Food Chem* 115: 318-323.
- Araujo P. 2009. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chrom B* 877(23): 2224-2234.
- Benincasa C, Lewis J, Perri E, Sindona G, Tagarelli A. 2007. Determination of trace element in Italian Virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. *Anal Chim Acta* 585: 366-370.
- Chen S, Lee B, Cheng, C. Chou, S. 2001. Determination of arsenic in edible fats and oils by focused microwave digestion and atomic fluorescence spectrometer. *J Food and Drug Anal* 9: 121-125.
- Çevik Yılmaz C. 2015. Zeytin ve Zeytin Ürünlerinin Bazı Makro ve Mikro İnorganik Bileşenlerin Analizi (Yüksek Lisans Tezi). Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Aydın.
- DPT 2001b. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu Metal Madenler Alt Komisyonu, İleri Teknoloji Hammaddeleri Çalışma Grubu Raporu, (DPT:2622-ÖİK.633), Ankara, 28 s.
- Keceli T, Turan Demirtaş E. 2001. Zeytinyağının beslenme ve biyolojik değeri. I.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 104-106. 17-18 Mayıs 2008, Balıkesir.
- Kilic S. 2018. Aromatik bitki ve yağlarının mineral element miktarlarının karşılaştırılması. *Gıda* 43 (4): 617-623.
- Mantzavinos D, Kalogerakis N. 2005. Treatment of olive mill effluents part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes-an overview. *Environ Inter* 31: 289-295.
- Oktav E, Çatakkaya EÇ, Şengül F. 2003. Zeytinyağı endüstrisi atık sularının kimyasal yöntemlerle arıtımı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Fen ve Müh Der* 5 (3): 11-21.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B. ve Bartsch H. 2000. Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants. *The Lancet Oncol* 1 (2): 107-112.
- Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. 2004. Trends in Quality in The Analytical Laboratory II. Analytical method validation and quality assurance. *Trac-Trend Anal Chem* 23(8): 535-552.
- Vinha AF, Ferreres F, Silva BM, Vanlentão P, Gonçalves A, Pereira JA, Oliveria MB, Seabra RM ve Andrade PB. 2005. Phenolic profiles of portuguese olive fruits (*olea europaea l.*): influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem* 89 (4): 561-568.



Investigation of *in vitro* antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* and *Syzygium aromaticum* extracts

Zerrin Kutlu¹ , Fadime Atalay Dumlu² , Ozlem Aydin Berktaş^{3*} , Fehmi Odabasoglu² 

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Atatürk University, 25240, Erzurum

² Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Kafkas University, 36100, Kars

^{3*} Department of Nursing, Healthy Science Faculty, Giresun University, 28100, Giresun

*Corresponding author : ozlem.berktas@giresun.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-4995-5433>

Received : 12/02/2020
Accepted : 17/06/2020

Abstract: In this study, total antioxidant activity (TAC), phenolic compound amounts (TPC) and reduction power (RP) of *Syzygium aromaticum* and *Glycyrrhiza glabra* species, widely used worldwide and our country, were investigated. Ethanol-water and methanol extracts of each type of spice samples were obtained by using the literature methods. In the ethanol-water extracts of *S. aromaticum* and *G. glabra* the TAC levels were determined to be at the highest level. When the TPC and RP between extracts listed, it was detected as methanol < ethanol-water. It was concluded that types of spices used as experimental materials thanks to TAC, TPC and RP could be priority in several *in vivo* and *in vitro* biological activity studies.

Keywords: *Glycyrrhiza glabra*, *Syzygium aromaticum*, antioxidant activity

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Free radicals containing one or more unpaired electrons in their atomic or molecular structure are high-energy, unstable, short-lived, low molecular weight compounds. Unpaired electrons in their structure giving reactivity free radicals damage the cell membranes, lipids, proteins, nucleic acids and DNA in the cells. Thus, diabetes, cancer, cardiovascular diseases, nervous system degenerative diseases are caused. Antioxidant system components of cells and tissues that inhibit free radicals caused by exogenous and endogenous sources prevent the progression of autoxidation / peroxidation (Odabasoglu et al., 2004, 2005; Odabasoglu, 2006a).

Functions of the antioxidants are repairing the damaged lipids, proteins and DNA molecules in the cell structure, neutralizing free radicals, suspension or suppression of free radical generating reactions and increasing the enzymatic and non-enzymatic antioxidant synthesis. So the high level of antioxidants in the organism is more advantageous. To sustain this advantage organisms can choose to increase their own antioxidants or to provide the outsourcing needs of antioxidants as well (Odabasoglu et al., 2004; 2005; Yucel et al., 2007).

The most remarkable parameters are reducing power and amounts of phenolic compounds in the effectively determining of antioxidant potential. The amount of phenolic substances and reducing power shows compatibility with antioxidant potential, depending on species and varieties. So, it is widely accepted that antioxidant activity in many plants is due to phenolic compound in the extracts. (Lee et al., 2000; Odabasoglu et al., 2004, 2005; 2006b; Yucel et al., 2007).

Today, although studies of antioxidants in higher plants have been conducted, searches have been limited in spices that has interesting features. Spice is obtained by grinding, drying or disintegration of seeds, fruit, flowers, bark, roots, leaves of various plants. It is defined as natural compounds or mixtures that are colouring and flavour agents (Odabasoglu, 2006a; Benavente-Garcia et al., 2000). Spices today alongside of flavor to food, antimicrobial, antioxidative, anti-hypertensive, anti-spasmodic, anti-inflammatory, antiallergic, antiulcerogenic, antipyretics, sedatives, neuroprotective, anesthetics, anti-tumor, antikolesterolemik and antiseptic effects of spices have been reported (Shan et al., 2005; Gruenwald et al., 2010; Allahghadri et al., 2010, Rohan et al., 2012; Rui et al., 2014, Shashank et. al., 2018, Vagih et. al., 2019; Cevik et al., 2019). In our country, clove and licorice are among the most

commonly consumed spices and there are some literature records about them. Antidiabetic, antiseptic, antifungal, antiviral, local anesthetic, antioxidant, neuroprotective, antithrombotic, anti-inflammatory, anticarcinogenic properties of clove have been explained (Gruenwald et al., 2010, Shashank et. al., 2018, Cevik et al., 2019). On the other hand there are some resources for licorice such as including inhibition histamine-induced ulceration, antioxidative, antimicrobial, detoxification, anti-platelet, laxative, antipyretic, atherosclerotic, hyperlipidemia, hypoglycemic, hypocholesterolemic, antitumoral, antiatherogenic, hepatoprotektif and memory booster effects (Lee and Shibamoto T 2001; Rohan et al., 2012; Rui et al., 2014, Abo El-Maati et al., 2016; Vagih et. al., 2019; Radünz et. al., 2019; Cevik et al., 2019).

In the present study, we aimed to offer an insight into consumption of some spices by measuring antioxidant potentials, the amounts of phenolic compounds and reducing power. In our research, antioxidant activity and reducing powers of ethanol-water, methanol extracts derived from clove and licorice spices consumed in our country was determined and we tried to show relationship between antioxidant potential and total phenolic compounds of extracts.

2. Materials and Method

Plant Materials: The species were provided by “Baghdad Spice”- (Turkey). After the materials were taken, they were stored in a dry and cool cabinet.

Extraction of plant materials: 100 g of spices samples were extracted separately with methanol (50 °C, 250 ml × 4) and ethanol-water (50 °C, 250 ml × 4, 50:50) for 2 days in a water bath with a shaking attachment. Then, the methanol and ethanol-water extracts were concentrated under reduced temperature and pressure using a rotary evaporator.

Antioxidant activity assays: Antioxidant activities of extracts were measured using the thiocyanate method of the protocol described previously by Mitsuda et al. (1996). For stock solutions, 1 mg sample was dissolved in 1 ml distillate water and added into 4 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) and 5 ml linoleic acid mixture. The same mixture without the sample was used as the negative control. The mixed solution in tube was incubated at 40°C. At 10-h intervals, aliquots of the reaction mixtures were taken for oxidation activity measured by ferric thiocyanate (FTC) assay. An aliquot 0.1 ml of the incubation mixture was mixed with 4.7 ml 75% ethanol followed by the addition of 0.1 ml 30% ammonium thiocyanate and 0.1 ml 20 mM ferrous chloride solution in 3.5% HCl. After 3 min, samples was measured at 500 nm (Mitsuda et al., 1996).

Reducing power assay: 0.5 mg sample was dissolved in 0.5 ml distillate water and added into 2.5 mL of $K_3Fe(CN)_6$ 1% w/v and 2.5 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6). The resulting mixture is incubated at 50 °C for 30 min, followed by the addition of 2.5 ml of trichloro acetic acid (10% w/v). This incubation mixture is centrifuged at 3000 rpm for 10 min to 2.5 ml supernatant, mixed with 2.5 ml distilled water and 0.5 ml of $FeCl_3$ (0.1%, w/v). The absorbance is then

measured at 700 nm against blank sample. This method is based on the principle of increase in the absorbance of the reaction mixtures. Increase in the absorbance indicates an increase in the antioxidant activity (Yen and Chen, 1997).

Determination of total phenolic contents: Spice extracts in total amount of phenolic compounds in accordance with the procedure described by Slinkard and Singleton (1997) and was determined using the Folin-Ciocalteu solution. The samples (0.5 mg in 0.5 ml solvent) were added into 2.5 ml of Folin–Ciocalteu oxidising reagent and 2 ml of Na_2CO_3 (7.5%). The resulting mixture is incubated at 30 °C for 90 min. After 90 min, absorbance of all samples was measured spectrophotometrically at 765 nm. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of lyophilisates.

Statistical analyses:

Statistical calculations were done by using SPSS 20.0 software. To determine the statistical significance of TAC, TPC and RP, one-way variance analyses (ANOVA) was applied showing that there was a statistically significant difference ($P < 0.05$).

3. Results and Discussion

Phenolic compounds one of the most important parameters in determination of antioxidant potential. Although antioxidant capacity can change with respect to the feature of phenolic compound, total phenolic content of the extract generally shows a good correlation with the antioxidant activity of the sample. Therefore, it is commonly accepted that antioxidant activity of many plant extract is explained by their phenolic content (Mitsuda et al., 1996; Yen and Chen, 1997; Odabasoglu et al., 2004; 2005). Today, due to the doubts on synthetic antioxidants, people prefer natural antioxidants (Schwarz et al., 2001; Odabasoglu et al., 2006a). So many studies are reported about investigation of antioxidant effects of plants and spices (Mathew and Abraham, 2006; Allahghadri et al., 2010; Gruenwald et al., 2010; Bettaieb et al., 2010; Rohan et al., 2012; Rui et al., 2014, Shashank et. al., 2018, Vagih et. al., 2019; Cevik et al., 2019). Although antioxidant capacity can change with respect to the feature of phenolic compound, total phenolic content of the extract generally shows a good correlation with the antioxidant activity of the sample. Reduction power is described as electron donor or ability to give electron to the free radicals and accepted to be one of the important parameters for a molecule which has antioxidant effect (Odabasoglu et al., 2004; 2005; Gulcin et al., 2006a; Koksall and Gulcin, 2008).

Dose dependent total antioxidant activity, reduction power and total phenolic content values of *S.aromaticum* and *Glycyrrhiza glabra*- ethanol-water extracts were monitored in Table 1. The ethanol-water extracts of *S.aromaticum* and *Glycyrrhiza glabra* exhibited potent antioxidant activities 92.5% inhibition of linoleic acid peroxidation. The highest inhibition, reduction power and total phenolic content values were obtained in 10 mg/ml (Table 2). The highest TAC was shown by the ethanol- water extracts of *S.aromaticum* and *Glycyrrhiza glabra*. In the present study,

there was no linear correlation between the TAC and TPC values of the all extracts. For example, although the ethanol-water extract of *S.aromaticum* and *Glycyrrhiza glabra* had highest TAC value, its exhibited a prooxidant activity in comparison with the control. On the contrary, the ethanol-water extract of the *S.aromaticum* had the highest value of TPC (Table 1) They also develop synergistic or antagonistic interactions with other phenolics or other types of components such as carbohydrates and proteins (Rice-Evans et al. 1997). In addition, nonphenolic compounds may play a major role in the antioxidant activity of plant material (Velioglu et al. 1998). Methanol is known to be one of the best solvents for extracting compounds such as phenolics and other polar materials in plants (Velioglu et al. 1998). The highest amount of TPC was shown by the methanol extract of *S.aromaticum* (Table 2). There are strong relationships between the TPC and TAC values of methanol extracts of *S.aromaticum* and *Glycyrrhiza glabra*. It has been found that spices have higher antioxidant activity as compared to fruits, cereals and nuts. Present results suggest that the antioxidant activity of some tested extracts might be attributed to the presence of phenolic and non-phenolic compounds. The active components in spices phthalides, polyacetylenes, phenolic acids, flavonoids, coumarins and terpenes are reported as powerful antioxidants. The different phytochemicals present greatly influence the biological activities possessed by plants/spices (Odabasoglu et al. 2006b; Gupta et al. 2017). Nevertheless, it should be taken into consideration that individual phenolic and non-phenolic may have distinct antioxidant activities; there may be antagonistic or synergistic interactions between phenolic, non-phenolic and other compounds like carbohydrates, proteins, etc.

Table 1. Antioxidant activity, total phenolic content and reducing power of *Syzygium aromaticum* and *Glycyrrhiza glabra* ethanol-water extracts

Samples	Doses (mg/ml)	TAC		RP	TPC
		Mean Absorbance	%	Mean Absorbance	(mg GAE/g lyophilisate)
		(50. hour, 500 nm)	Inhibition	(700 nm)	
SAEWE	1	0.173±0.002 ^c	87.7	2.057±0.002 ^a	3.705±0.001 ^a
	5	0.153±0.005 ^b	89.1	3.699±0.001 ^b	3.798±0.002 ^b
	10	0.105±0.002 ^a	92.5	3.809±0.003 ^c	3.896±0.002 ^c
GGEWE	1	0.227±0.003 ^c	83.9	0.329±0.001 ^a	0.430±0.002 ^a
	5	0.149±0.020 ^b	89.4	0.933±0.001 ^b	1.463±0.001 ^b
	10	0.105±0.001 ^a	92.5	1.762±0.002 ^c	2.472±0.001 ^c
Ascorbic acid	1	0.152±0.001 ^b	89.2	-	-
Trolox	1	0.142±0.001 ^b	90.0	-	-
Control (water)	-	1.407±0.002 ^d	-	-	-

The values are presented as mean ± SD. Significant at p < 0.05. Values with the same letter are not different according to Duncan test for statistical purposes. SAEWE: Ethanol-water extract of *Syzygium aromaticum* and GGEWE: Ethanol-water extract of *Glycyrrhiza glabra*

Table 2. Antioxidant activity, total phenolic content and reducing power of *Syzygium aromaticum* and *Glycyrrhiza glabra* methanol extracts.

Samples	Doses (mg/ml)	TAC		RP	TPC
		Mean Absorbance	%	Mean Absorbance	(mg GAE/g lyophilisate)
		(50. hour, 500 nm)	Inhibition	(700 nm)	
SAME	1	0.252±0.001 ^c	76.8	1.366±0.002 ^a	3.507±0.002 ^a
	5	0.234±0.001 ^d	78.5	3.551±0.002 ^b	3.873±0.002 ^b
	10	0.225±0.002 ^c	79.3	3.631±0.052 ^b	3.975±0.001 ^c
GGME	1	0.355±0.003 ^c	64.7	0.264±0.002 ^a	0.421±0.001 ^a
	5	0.203±0.001 ^d	81.3	0.864±0.003 ^b	3.507±0.001 ^b
	10	0.193±0.001 ^c	82.2	1.112±0.008 ^c	3.871±0.001 ^c
Ascorbic acid	1	0.134±0.001 ^a	87.7	-	-
Trolox	1	0.171±0.002 ^b	84.3	-	-
Control (water)	-	1.088±0.001 ^f	-	-	-

The values are presented as mean ± SD. Significant at p < 0.05. Values with the same letter are not different according to Duncan test for statistical purposes. SAEWE: Methanol extract of *Syzygium aromaticum* and GGEWE: Methanol extract of *Glycyrrhiza glabra*

5. Conclusion

It is concluded that spices used in this study as experimental material may be evaluated in *in vivo* and *in vitro* biological activity studies due to their antioxidant activity, reduction power and total phenolic content characteristics.

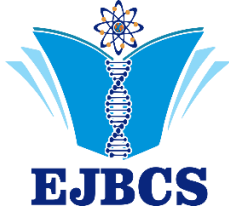
Conflict of interest disclosure:

No conflict to interest.

References

- Abo El-Maati MF, Mahgoub SA, Labib SM, Al-Gaby AMA, Ramadan MF 2016. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *Europ J Int Med* 8 (4): 494-504.
- Allahghadri T, Rasooli I, Owlia P, Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, Astaneh SD 2010. Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. *J Food Sci* 75: H54-61.
- Antignac JP, Cariou R, Maume D, Marchand P, Monteau F 2008. Exposure assessment of fetus and newborn to brominated flame retardants in France: preliminary data. *Mol Nutr Food Res* 52: 258-265.
- Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del-Rio JA 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L-leaves. *Food Chem* 68 (4): 457-462.
- Bettaieb I, Bourgou S, Wannas WA, Hamrouni I, Limam F, Marzouk B 2010. Essential oils, phenolics, and antioxidant activities of different parts of cumin (*Cuminum cyminum* L.) *J Agri Food Chem* 58 (19): 10410-10418.
- Cevik D, Kan Y, Kirmizibekmez H, 2019. Mechanisms of action of cytotoxic phenolic compounds from *Glycyrrhiza ionicica* roots. *Phytomedicine* 58:152872
- Fajardo AJ 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 34: 44-65.

- Gruenwald J, Freder J, Armbruester N, 2010. Cinnamon and health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50: 822-34.
- Gülcin I, Elias R, Gepdiremen A, Boyer L, 2006a. Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Eur Food Res Technol* 223: 759-767.
- Gupta, M ; Sharma, C ; Meena, P ; Khatri, M, 2017. Investigating the free radical scavenging and acetylcholinesterase inhibition activities of *Elletaria cardamomum*, *Piper nigrum* and *Syzygium aromaticum*. *nt J Pharm Sci Res* 7 (8): 3180-3186.
- Koksal, E; Gulcin, I, 2008. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) buds. *Protein Pept Lett* 15 (4): 320-326.
- Lee K, Shibamoto T, 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chem* 74 (4): 443-448.
- Lee KY, Weintraub ST, Yu BP, 2000. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radic Biol Med* 28: 261-5.
- Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martinez-Solano L, Sanchez MB 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 34: 44-65.
- Martinez JL, Garmendia L 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 34: 44-65.
- Mathew S, Abraham TE, 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food and Chem Toxicol* 94: 520-528.
- Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K, 1996. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 19: 210-214.
- Odabasoglu F, 2006a. Antioksidan vitaminler. *Pharma Sark* 1 (1): 19-21.
- Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Bayir Y, Halici M. 2005. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia* 76 (2): 216-219.
- Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, Kazaz C, 2006b. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 103 (1): 59-65.
- Radünz M, Martins da Trindade ML, Camargo TM, Radünz AL, Helbig E, 2019. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil, *Food Chem* 276: 180-186.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2: 152-159.
- Rohan NA, Mayuresh KR, Suresh RN, 2012. Evaluation of antiallergic and anti-anaphylactic activity of ethanolic extract of *Sanseveiria trifasciata* leaves (EEST) in rodents. *J Ethnopharm* 142 (3): 627-633.
- Rui Y, Li-qiang W, Ying L, 2014. Antitumor activities of widely-used Chinese Herb-Licorice. *Chin Herbal Med* 6 (4): 274-281.
- Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, Gardner PT, Heinonen MI, 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Euro Food Res Technol* 212: 319-328.
- Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H, 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agri Food Chem* 53: 7749-59.
- Shashank S, Yudhishtir Y, Amrendra PS, Rashmita P, Sharmistha D, 2018. Neuroprotection by ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* in Alzheimer's disease like pathology via maintaining oxidative balance through SIRT1 pathway. *Exp Gerontol* 110: 277-283.
- Slinkard K, Singleton VL, 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. 28: 49-55. *American J Endol Vit*
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD, 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem* 46: 4113-4117.
- Wagih A.E, Sameh SA, Hegazy MH, Manar KE, Jianzhong S, 2019. *Syzygium aromaticum* L.: Traditional herbal medicine against cagA and vacA toxin genes-producing drug resistant *Helicobacter pylori*. *J Tradit Complement Med* (Available online 15 May 2019 In Press, Corrected Proof)
- Yen GH, Chen HY, 1997. Antioxidant activity of a various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agri Food Chem* 43: 27-32.
- Yucel O, Odabasoglu F, Gulluce M, Calik ZZ, Cakir A, Aslan A, Yazici K, Halici M, 2007. Antioxidant and antimicrobial properties of a lichen species, *Cladonia rangiformis* growing in Turkey. *Turkish J Pharmac Sci* 4 (2): 101-109.



Şıçanlarda Metformin Kullanımının Karaciğer Dokuları Üzerine Morfolojik Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopisi ile Değerlendirilmesi

Elif Aksöz^{1*}, Bükay Yenice Gürsu², Büşra Aslan¹, Betül Yılmaz Öztürk², İlknur Dağ²

¹ Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

² Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ESOGÜ-ARUM), Eskişehir, Türkiye

*Corresponding author : aksoz@balikesir.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-4827-804X>

Received : 09/05/2020
Accepted : 17/06/2020

Özet: Metformin, tip II diyabet için en sık reçete edilen oral anti-diyabetik ajandır. Genellikle güvenli bir ilaç olarak kabul edilir, ancak hepatotoksik etkisi de olabileceği bildirilmektedir. Literatürde metforminin karaciğer dokusundaki morfolojik ve ultrayapısal etkilerini değerlendiren çalışmalar, daha çok deneysel olarak oluşturulan bir karaciğer hasarını azaltıp azaltmadığı yönündedir. Ancak bu ilaç polikistik over sendromu gibi, herhangi bir karaciğer rahatsızlığı olmayan hastalarda da kullanılabilmektedir. Bu çalışmadaki amacımız herhangi bir karaciğer hastalığı yok iken metformin kullanımının karaciğerde herhangi bir değişime neden olup olmadığını ışık ve geçirimsiz elektron mikroskopisi yardımı (TEM) ile değerlendirmektir. Bu amaçla Wistar Albino erkek şıçanlar kontrol ve metformin grubu olarak iki gruba ayrılmıştır. Metformin grubuna üç hafta boyunca metformin (100mg / kg) uygulanmış ve kontrol grubuna eşit hacimde serum fizyolojik verilmiştir. Bir haftalık ilaçsız dönemden sonra şıçanlardan ketamin/ksilazin anestezisi altında karaciğer örnekleri alınmış ve ötenazi uygulanmıştır. Biyopsi sonrası karaciğer örnekleri ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için rutin TEM takibine alınmışlardır. Örneklerden elde edilen yarı ince (700 nm) ve TEM için alınan tam ince (60 nm) kesitler önce ışık mikroskobu ile sonra da Hitachi HT 7800 TEM ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu örneklerinde düzenli hepatosit, çekirdek ve çekirdekçik içeren sağlıklı bulgular izlenirken, metformin uygulanan örneklerde bol miktarda koful oluşumu, çekirdek düzensizlik ve küçülmeleri, bol kan damarı ve hepatosit ayrılmaları gözlenmiştir. Çalışmamızın bulguları metforminin uzun süreli kullanımda hepatositler üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Metformin, karaciğer, TEM

Evaluation of morphological effects on liver tissues of metformin use in rats by light and electron microscopy

Abstract: Metformin is the most commonly prescribed oral anti-diabetic agent for type II diabetes. It is generally considered as a safe drug but it is reported that it may also have a hepatotoxic effect. Studies in the literature evaluating the morphological and ultrastructural effects of metformin on liver tissue are more likely include whether it reduces an experimentally created liver injury. However, this drug can also be used in patients without any liver disease, such as polycystic ovarian syndrome. Our aim in this study is to evaluate whether metformin use causes any change in the liver with the help of light and permeable electron microscopy (TEM) while there is no liver disease. For this purpose, Wistar Albino male rats were divided into two groups as control and metformin groups. Metformin (100mg/kg) was applied to the metformin group for three weeks and an equal volume of saline was given to the control group. Liver samples were taken from rats under ketamine/xylozine anesthesia after one week of the drug-free period and euthanasia was performed. After biopsy, liver samples were taken for routine TEM procedure for light and electron microscopic examinations. Semithin (700 nm) and ultrathin (60 nm) sections from samples were evaluated by firstly light microscope and then Hitachi HT 7800 TEM. While healthy findings including regular hepatocyte, nucleus and nucleolus were observed in the control group samples, abundant vacuol formation, nuclear irregularity and shrinkage, abundant blood vessel and hepatocyte separation were observed in metformin-treated samples. The findings of our study show that metformin may have adverse effects on hepatocytes in long-term use.

Keywords: Metformin, liver, TEM

1. Giriş

Metformin, tüm dünyada yaygın olarak görülen Tip 2 Diabetes Mellitus (DM) tedavisinde en sık reçete edilen ilaçtır (Wang ve ark., 2017). Diyabetli hasta sayısının 2019 yılında dünya genelinde 463 milyon olduğu ve Tip 2 DM hastalarının diyabetik popülasyonun yaklaşık %90'ını oluşturduğu bildirilmektedir (Saeedi ve ark., 2019). Bu hastaların çoğu metformin kullanımına adaydır. Tüm bunların yanında son yıllarda, kan glukozunu düşürücü etkisine ek olarak, birçok çalışma metformin için antitümör, antiaging, nöroprotektif ve kardiyovasküler koruyucu etkiden bahsetmekte (Wang ve ark., 2017), ayrıca, antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri olabileceği de düşünülmektedir (Martin-Montalvo ve ark., 2013). Bu nedenlerle metforminin başka hastalıklarda da terapötik kullanımları üzerine araştırmalar artış göstermiştir. Kanser, metabolik sendrom, obezite, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ve polikistik over sendromu (PCOS) gibi hastalıkların tedavisinde de metforminin etkili olduğu gözlenmektedir (Zhou ve ark., 2018). Bu da metformin kullanımının daha da artabileceği manasına gelmekte ve metforminin kullanım güvenliliği ile ilgili araştırmaların önemini göstermektedir.

Metformin, genellikle güvenli kabul edilmektedir. Bununla birlikte, ishal, gastrointestinal sistem rahatsızlığı, karın ağrısı, bulantı, metalik tat, halsizlik, baş ağrısı, baş dönmesi ve döküntü gibi yan etkileri de olabilir. Nadir fakat potansiyel olarak ciddi yan etkileri ise laktik asidoz, hipoglisemi, dehidrasyon ve aşırı duyarlılık reaksiyonları olarak sayılabilir (Livertox, 2020). Yapılan çalışmalarda metforminin plazma, pankreas ve yağ dokudan daha yüksek oranda karaciğerde biriktiği tespit edilmiştir (Madiraju ve ark., 2014). Metformin kullanımına bağlı olarak belirgin karaciğer hasarının nadir olarak görüldüğü söylenmekle beraber, karaciğerde hepatosellüler ve kolestatik hasar ya da ikisinin de tespit edildiği vakalar rapor edilmiştir (Kutoh, 2005; Cone ve ark., 2010, Hashmi, 2011; Zheng, 2016). Hepatotoksisite genellikle 1-8 haftalık kullanımdan sonra, halsizlik ve yorgunluk belirtilerini takiben sarılıkla ortaya çıkmaktadır. Metformin tedavisi durdurulduktan sonra iyileşmenin genellikle hızlı olduğu bildirilmektedir (Livertox, 2020).

Metforminin karaciğerdeki etkileri üzerine şimdiye kadar yapılan çalışmalarda genellikle çeşitli karaciğer rahatsızlıkları durumunda metforminin etkileri incelenmiş; koruyucu ve terapötik etkileri rapor edilmiştir (Iranshahy ve ark., 2019). Bununla beraber, metforminin herhangi bir patolojisi olmayan normal karaciğer üzerine etkileri konusunda çok sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, karaciğer hastalığı bulunmayan sıçanlarda metformin kullanımının karaciğer dokularında herhangi bir ultrayapısal değişime neden olup olmadığını ışık ve geçirimli elektron mikroskopik yöntemlerle araştırmaktır.

2. Materyal ve Metod

Çalışmada 20 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanılmıştır. Deneysel süresince hayvanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsü içerisinde yem ve su alımları serbest bırakılarak, sıcaklığı sabit tutulan (21±3°C) odada barındırılmıştır. Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu 2020/3-10 nolu onayı ile gerçekleştirilmiştir.

2.1. Deneysel Prosedürü

Deneysel hayvanları kontrol ve metformin grubu olarak iki gruba ayrılmıştır. Metformin (met) (METFULL 1000 mg efervesan tablet, Vitalis İlaç, Türkiye) %0,9 salinde çözülerek hazırlanmıştır. Kontrol gruplarına 3 hafta süreyle gavajla oral salin, metformin grubuna üç hafta süreyle gavajla oral 100 mg/kg/gün olacak şekilde ilaç uygulanmıştır. Üç haftalık uygulama sonunda ilaç kesilmiş, 1 hafta ilaçsız dönem bırakılmış ve metforminin hafıza etkilerini değerlendirmek için Morris maze labirent testi uygulanmıştır. Takiben ketamin/ksilazin anestezisi altında karaciğer örnekleri alınmış ve servikal dislokasyonla ötenazi uygulanmıştır. Alınan karaciğer örnekleri 0.1 M fosfat tamponunda hazırlanan %2.5'lük glutaraldehit ön fiksasyon solusyonuna alınmıştır. 24 saat sonunda hücreler 3 kez PBS tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra 0.1 M fosfat tampon içeren %1'lik osmiyum tetroksit ile oda sıcaklığında ve rotatorda 2 saat süreyle karanlıkta dokuların sekonder fiksasyonu tamamlanmıştır. Dokular PBS tamponla tekrar 3 kez yıkanarak dehidrasyon işlemi için giderek artan konsantrasyonlarda ve 4°C'de ikişer kez 15'er dk etil alkol serilerinden geçirilmiştir. (%30, %50, %70, %90, %96, %100). Dehidrasyon sonrası propilen oksitte 30 dk boyunca iki kere şeffaflaştırma işlemi yapılmıştır. Propilen oksit- araldit karışımı ile 2 saat rotator inkubasyon uygulaması sonrası örnekler saf araldite alınarak ve bir gece boyunca rotatorda tutularak, ertesi gün resine gömülmüş ve 60°C'de 48 saat polimerize olan resin içerisine gömülü doku blokları elde edilmiştir.

2.2. Işık Mikroskopik Uygulamalar

Işık mikroskopisi çalışmaları için elde edilen doku bloklarından ultramikrotom (Leica Ultracut R) cihazı ile 700 nm kalınlığında kesitler alınmış ve toluidin mavisiyle boyanarak yarı ince kesit preparatları ışık mikroskopunda incelenmeye hazır hale getirilmiştir.

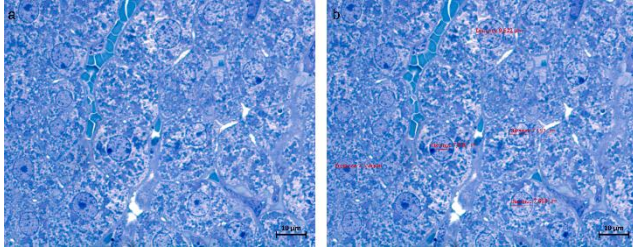
2.3. Geçirimli Elektron Mikroskopik Uygulamalar

TEM uygulamaları için yarı ince kesitler ile bölge belirlemesi sonrası örnekler ultramikrotomda (Leica Ultracut R) 60 nm kalınlığında kesilerek elde edilen doku kesitleri bakır gridlere (200 mesh EMS) alınmış ve uranil asetat-kurşun sitrat ile boyandıktan sonra elektron mikroskopik (Hitachi HT 7800) incelemeler gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Işık Mikroskopik Veriler

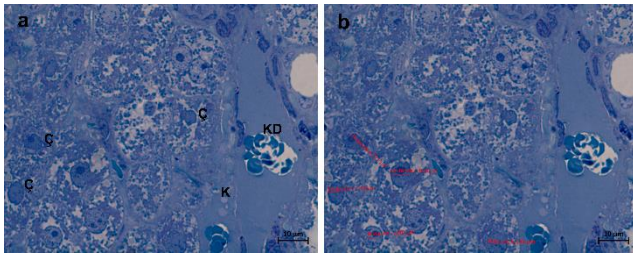
Işık mikroskopi yardımıyla gerçekleştirdiğimiz histolojik çalışmada, kontrol ve deney gruplarından alınan karaciğer örneklerinin rutin fiksasyon işlemleri ve kimyasal takipleri yapılmış ve elde edilen bloklardan ultramikrotomla yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmaları sağlanmıştır. Kontrol grubu örneklerinde normal histolojik bulgular tespit edilmiştir. Hepatosit yapıları düzenlidir, çekirdek yuvarlak ve çekirdekçik görünümleri normaldir. Sitoplazma homojen bir dağılım göstermekte ve doku bütünlüğünün genel olarak iyi korunduğu gözlenmektedir (Şekil 1 a).



Şekil 1a. Sıçan karaciğer biyopsi örneklerinden elde edilen sağlıklı histolojik yapı ve hepatosit organizasyonuna sahip kontrol grubu örneği, b. Kontrol grubu örneklerinde değerlendirmeye alınan hepatosit çap ölçümlerine ait demonstratif resim. Toluidin mavisi, 10 μ m.

Çalışmamızdan elde edilen ışık mikroskopik görüntülerde hepatosit çekirdek çapları için kantitatif bir değerlendirme yapabilmek için her hayvan için hazırlanan preparatlardan en az beş farklı alan taranmış ve toplamda 50'şer çekirdeğin çapı ölçüldükten sonra ortalama değerleri alınmıştır. Buna göre kontrol grubu verilerinden elde edilen hepatosit çekirdeklerinin ortalama çapları 7.50 μ m olarak ölçülmüştür (Şekil 1 b).

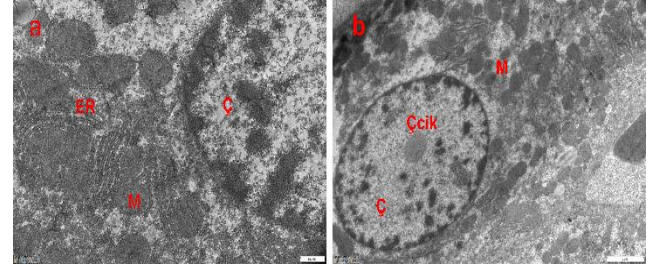
Metformin uygulanan örneklerde ise koful oluşumu fazladır, çekirdek yapıları daha düzensiz olup genellikle küçülme göstermiştir. Bazı hepatositler çift çekirdeklidir. Bol miktarda kan damarı, hepatosit stoplazmasında homojenite kayıpları ve düzensizlikler izlenmiştir. Eritrosit miktarındaki artış dikkat çekicidir ve nekrotik bir görünüm vardır (Şekil 2 a). Deney grubu verilerinden elde edilen hepatosit çekirdeklerinin ortalama çapları ise ortalama 5.3 μ m olarak ölçülmüştür (Şekil 2 b).



Şekil 2a. Metformin uygulanan sıçan karaciğer biyopsi örneklerinden elde edilen ve çekirdek küçülmesi, hepatosit düzensizlikleri ve nekrotik görünüm içeren demonstratif ışık mikroskobu görüntüsü, Ç: Çekirdek, K: koful oluşumu, KD: Kan damarları; b. Değerlendirmeye alınan hepatosit çap ölçümlerine ait demonstratif resim. Toluidin mavisi, 10 μ m.

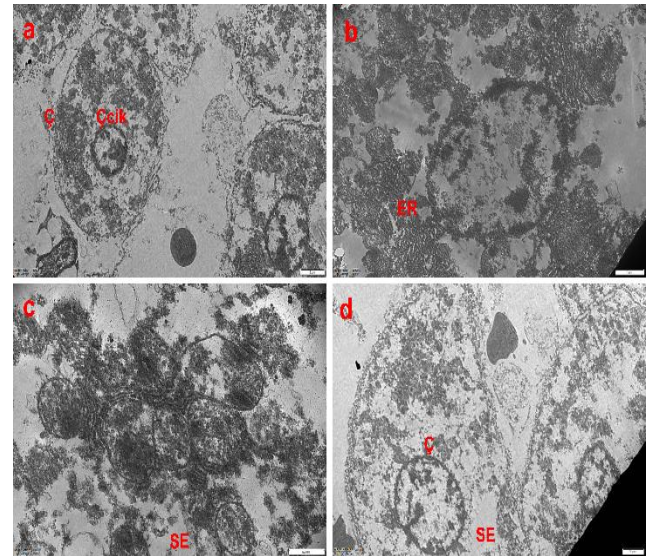
3.2. Geçirimli Elektron Mikroskopik Veriler (TEM)

Karaciğer örneklerinde kontrol ve metformin uygulamasının ultayapısal analizi TEM ile yapılmıştır. Kontrol grubunu içeren TEM mikrografları sağlıklı bir histolojik görünüme sahiptir. Çekirdek yuvarlak ve ökromatik bir görünümde; çekirdekçik merkezi yerleşimlidir. Stoplazmada yuvarlak ya da oval şekilli mitokondriler ile düzenli bir dağılım gösteren granüllü endoplazmik retikulum yapıları izlenmiştir. Sitoplazmada az sayıda yağ damlacıkları mevcuttur (Şekil 3 a-b).



Şekil 3 a-b. Kontrol grubundan elde edilen ve sağlıklı sıçan karaciğer morfolojisi içeren demonstratif TEM görüntüleri; ER: Endoplazmik retikulum, M: Mitokondri, Ç: Çekirdek. Çcik: Çekirdekçik. Skala bar a. 500 nm, b. 2 μ m.

Deney grubu örneklerinde ise hepatositlerde küçülme ve hücre hasarları görülmüştür. Çekirdek yapıları da buna paralel olarak küçüktür ve düzensiz görünümündedir. Stoplazma köpüksü görünüm denilen bir morfolojide olup bu durum genellikle glikojen birikimi ya da düzensiz endoplazmik retikulumun genişlemesi ile ortaya çıkmaktadır. Mitokondriler yer yer birbirine çok yakın halde bir arada ve düzensiz morfolojidedir, krista hasarı ve ER kırıkları da gözlenmiştir. Yer yer nekrotik alanlar ve yağ damlacıkları bulunmaktadır. Az sayıda hücre ise normal morfolojisini korumuştur (Şekil 4 a-b-c-d).



Şekil 4 a-b-c-d. Metformin uygulanan gruptan elde edilen, hepatosit ve çekirdek küçülmesi, mitokondri ve ER hasarı içeren ve nekrotik bir görünüm sergileyen demonstratif TEM görüntüleri; ER: Endoplazmik retikulum, M: Mitokondri, Ç: Çekirdek. Çcik: Çekirdekçik, SE: Sitoplazma erimesi. Skala bar a. 500 nm, b. 2 μ m.

4. Tartışma

Metformin, son yıllarda dünyada en yaygın reçetelenen ilaçlardan biri haline gelmiştir (Foretz ve ark., 2014). Genellikle güvenli bir ilaç olarak kabul edilir, ancak birçok vaka raporunda hepatotoksik etkisi olabileceği bildirilmektedir (Kutoh, 2005; Cone ve ark., 2010, Hashmi, 2011; Zheng, 2016). Hepatotoksisite, genellikle halsizlik ve yorgunluk belirtilerini takiben sarılıkla ortaya çıkmaktadır. Metformin tedavisi durdurulduktan sonra hızla iyileşme olduğu belirtilmektedir (Livertox, 2020). Çalışmamızda, sıçanlara üç hafta süreyle metformin uygulanmış, bir hafta ilaçsız dönem bırakılmış ve sıçan karaciğer dokularında kontrol grubuna göre herhangi bir ultrayapısal değişim olup olmadığı ışık ve geçirimli elektron mikroskopik yöntemlerle araştırılmıştır. İlaçsız döneme rağmen metforminin mitokondri ve hepatosit yapıları üzerinde belirgin etkilerinin olduğu görülmüştür. Metformin uygulanan sıçanların karaciğer örneklerinde dejeneratif ve hasarlı bulgular izlenmiş; hepatosit ve çekirdek düzensizlikleri, mitokondriyal hasarlar ve bütünlük bozulması gibi temel bulgular tespit edilmiştir.

Metformin, mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I'i inhibe ederek, ATP sentezini azaltır ve hücrel AMP: ATP oranında bir artışa yol açar (Brunmair ve ark., 2004). Asıl etkisini ise, AMP ile aktifleştirilmiş protein kinazı aktive ederek glukoz sentezini inhibe ettiği karaciğerde gösterir (Rena ve ark., 2017). Bununla beraber metforminin etki mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir.

Metforminin, Tip 2 DM'den başka, kanser, metabolik sendrom, obezite, NAFLD ve PCOS gibi hastalıkların tedavisinde de yararlı etkileri olduğu söylenmektedir (Zhou ve ark., 2018). Hepatositlerde trigliserit (TG) birikimi NAFLD'nin ayırt edici özelliğidir. Metformin, in vivo ve in vitro yüksek glukozlu ya da yüksek yağlı diyetle (HFD) indüklenen hepatik TG birikimini baskılamıştır (Song ve ark., 2013). Obez farelerde hepatik ve plazma TG düzeyleri metformin ile doza bağımlı bir şekilde azaltılmıştır (Li ve ark., 2016; Lin ve ark., 2017). Ayrıca serum alanin transaminaz seviyelerinde iyileşme yaptığı da bildirilmiştir (Doycheva ve ark. 2014). Bununla birlikte, NAFLD'nin tedavisinde metforminin terapötik etkinliği ile ilgili klinik kanıt bulunmamaktadır. Uygun ve arkadaşlarının çalışmasında, 6 aylık metformin tedavisi, alkolsüz steatohepatiti olan hastalarda insülin direnci ve karaciğer enzimlerinde iyileşme sağlamış, fakat bazı hastalarda steatohepatitin şiddetini artırmıştır (Uygun ve ark., 2004). Deney hayvanları kullanılarak yapılan bir çalışmada HFD ile indüklenen NAFLD, metformin tedavisi ile ancak kısmen azaltılmıştır. Metformin, karaciğerde ve hepatosit kültürlerinde pro-enflamatuar sitokinleri artırmış, hatta karaciğer inflamasyonuna yol açmıştır (de Souza Teixeira ve ark., 2018). Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızın sonuçları ile de tutarlıdır. Metformin hepatositlerde beklenen etkisini göstermiş, TG birikimini azaltmıştır, fakat hepatositlerdeki steatohepatit belirtilerini ve inflamasyonu iyileştirememiş, hatta artırmıştır.

Gopal ve arkadaşları, streptozosinle indüklenmiş diyabetli ratlarda 250mg/kg metforminin diyabete bağlı oluşan anormal karaciğer hücrelerinin oluşumunu baskıladığını rapor etmişlerdir (Gopal ve ark., 2014). Al Hashem ve arkadaşları thioacetamide ile indüklenmiş hepatik hasarda 200mg/kg/gün metforminin koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Metforminin karaciğer fibrozunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve karaciğerin yapısını kısmen koruduğunu bildirmişlerdir (Al-Hashem ve ark., 2018). Her iki çalışmada kullanılan metformin dozları bizim çalışmamızdan farklıdır. Ayrıca, bizim çalışmamızda olduğu gibi sağlam karaciğerde metforminin etkileri araştırılmamış, karaciğerde hasar oluşturulup metforminin bu hasara karşı koruyucu etki gösterip göstermeyeceği değerlendirilmiş ve sadece kısmi bir korumadan bahsedilmiştir.

Metformin, temel olarak hepatik glukoz üretimini azaltarak glisemik kontrolü geliştirmektedir. Aynı zamanda periferik insülin duyarlılığını artırır, gastrointestinal glukoz absorpsiyonunu engeller, barsak mikrobiyotasını modüle eder ve incretin aksisini uyandır (Tang ve ark., 2016). Bu nedenlerle obezitede kilo kaybetme amaçlı olarak giderek artan biçimde kullanılmaktadır (Tang ve ark., 2016). Ayrıca, doğurgan çağıdaki kadınların yaklaşık %4-12 sini etkileyen PCOS'da oluşan insülin direncini engellemekte de kullanılmaktadır. (Lashen ve ark., 2010).

Karaciğer hastalıklarının teşhisinde çeşitli biyokimyasal belirteçler ya da görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Bununla beraber, karaciğer patolojisinin tayini ya da teşhisinde karaciğer biyopsi örnekleri altın standart olarak kabul edilmektedir (Ahishali ve ark., 2010). Karaciğerle ilgili morfoloji ve ultrayapı çalışmalarında değerlendirilen kriterler başlıca hepatosit yapıları, çekirdek ve organel hasarları, kollagen birikimleri, mitokondri hasarları ve yağ damlacıklarının bulunuşu olarak sıralanabilir (Soliman ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda da temel olarak bu bulgular değerlendirilmiştir. Metformin uygulanmış örneklerde ultrayapısal farklılıklar tespit edilmiştir. TEM verileri ile farklı organel ve hücrel yapıların ultrayapısal analizi gerçekleştirilmiş, fakat en belirgin etkilerin mitokondri ve hepatosit yapıları üzerine olduğu görülmüştür. Metformin uygulanan gruplarda dejeneratif ve hasarlı bulgular izlenmiş; hepatosit ve çekirdek düzensizlikleri, mitokondriyal hasarlar ve bütünlük bozulması gibi temel bulgular tespit edilmiştir.

Metformin kullanımıyla ilişkilendirilen vakalarda, akut hepatik hasarın idiyosenkratik reaksiyona işaret ettiği öngörülmektedir (Cone ve ark., 2010). Hastalar için önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan idiyosenkratik ilaç reaksiyonlarının en yaygın hedeflerinden biri de karaciğerdir (Utrecht ve Naisbitt, 2013). İdiyosenkratik reaksiyonlar doz ile ilişkili değildir ve kişiye bağlı değiştiği için önceden tahmin edilemez. Ortaya çıkışında eş zamanlı kullanılan diğer ilaçların, yaşın, cinsiyetin ve çevresel faktörlerin etkisi olabileceği düşünülmekte, aynı zamanda genetik faktörlerin üzerinde durulmaktadır. İlaçları metabolize eden enzimler, antioksidan enzimler, ilaç taşıyıcıları, inflamasyon yanıtı

ve ana histo-uyumluluk kompleksi protein sınıfında genetik farklılıklar bu reaksiyonun oluşumuna katkıda bulunabilir (Chalasanı ve Björnsson, 2010; Ng ve ark., 2012). Verilerimiz, metformin kullanımına bağlı hücre ultrayapısındaki değişimleri göstermekle birlikte olası mekanizmaların ortaya konulabilmesi için kapsamlı yolak deneylerinin yapılması gerekmektedir.

Çok yönlü etkilere sahip bir ilaç olan metformin, faydalı etkileri nedeniyle potansiyel olarak yeni klinik uygulamalar için önerilmektedir. Bununla birlikte, tüm bu yeni tedavi endikasyonlarını destekleyen çok az klinik kanıt bulunmaktadır. Metformin kullanımına bağlı karaciğer hasarı bildiriminin az olmasının nedeni, metforminin genellikle diğer ilaçlarla birlikte kullanılması ve hasarın metforminden mi, yoksa yanında kullanılan başka bir ilaçtan mı kaynaklandığını belirlemenin zor olması da olabilir. Tüm bu nedenlerle metforminin kullanımıyla ilgili hepatotoksitenin araştırılması önem taşımaktadır (Gharbaran, 2014).

Çalışmamızın bulguları, metforminin uzun süreli kullanımda hepatositler üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, metforminin birçok potansiyel yararlılıkları olmasına rağmen, güvenilirlikle ilgili problemleri de olabileceği görülmektedir. Metforminin terapötik uygulamasının genişletilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

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

Kaynaklar

Ahishali E, Demir K, Ahishali B, Akyuz F, Pinarbasi B, Poturoglu S, İbrism D, Gulluoglu M, Ozdil S, Besisik F, Kaymakoglu S. 2010. Electron microscopic findings in non-alcoholic fatty liver disease: Is there a difference between hepatosteatosis and steatohepatitis? *Gastroenterol Hepatol.* 25(3): 619-626

Al-Hashem F, Al-Humayed S, Amin SN, Kamar SS, Mansy SS, Hassan S, Abdel-Salam OL, Ellatif MA, Alfaifi M, Haidara MA, Al-Ani B. 2019. Metformin inhibits mTOR-HIF-1 α axis and profibrogenic and inflammatory biomarkers in thioacetamide-induced hepatic tissue alterations. *J Cell Physiol.* 234(6): 9328-9337

Brunmair B, et al. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhäusl W, Fürsinn C. 2004. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes.* 53(4):1052-9

Chalasanı N, Björnsson E. 2010. Risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury. *Gastroenterology.* 138(7):2246-2259. doi:10.1053/j.gastro.2010.04.001

Cone CJ, Bachyrycz AM, Murata GH. 2010. Hepatotoxicity associated with metformin therapy in treatment of type 2 diabetes mellitus with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Pharmacother.* 44(10):1655-9. doi: 10.1345/aph.1P099

de Souza Teixeira AA, Souza CO, Biondo LA, Sanches Silveira L, Lima EA, Batatinha HA, Araujo AP, Alves MJ, Hirabara SM, Curi R, Neto JCR. 2018. Short-term treatment with metformin reduces hepatic lipid accumulation but induces liver inflammation in obese mice. *Inflammopharmacology.* 26(4):1103-1115. doi:10.1007/s10787-018-0443-7

Doycheva I, Loomba R. 2014. Effect of metformin on ballooning degeneration in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): When to use metformin in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) *Adv Ther.* 31:30-43. doi: 10.1007/s12325-013-0084-6.

Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I, Purcărea VL, Hudita D. 2015. Metformin-clinical pharmacology in PCOs. *J Med Life.* 8(2):187-92

Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 20(6):953-66. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.018

Gharbaran R. 2014. Metformin Induces Ultrastructural Alterations in Hepatocytes of Spontaneously Hypertensive Rats. *Int J Morphol.* 32(3):839-843

Gopal V, Mandal V, Tangjang S, Mandal SC. 2014. Serum Biochemical, Histopathology and SEM Analyses of the Effects of the Indian Traditional Herb Wattakaka Volubilis Leaf Extract on Wistar Male Rats. *J Pharmacopuncture.* 17(1):13-19. doi:10.3831/KPI.2014.17.002

Hashmi T. 2011. Probable hepatotoxicity associated with the use of metformin in type 2 diabetes. *BMJ Case Rep.* 13:2011. doi:10.1136/bcr.04.2011.4092

Iranshahy M, Rezaee R, Karimi G. 2019. Hepatoprotective activity of metformin: A new mission for an old drug? *Eur J Pharmacol.* 850:1-7. doi:10.1016/j.ejphar.2019.02.004

Kutoh E. 2005. Possible metformin-induced hepatotoxicity. *Am J Geriatr Pharmacother.* 3(4):270-3

Lashen H. 2010. Role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 1(3): 117-128

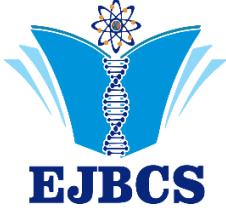
Li R, Chen LZ, Zhao W, Zhao SP, Huang XS. 2016. Metformin ameliorates obesity-associated hypertriglyceridemia in mice partly through the apolipoprotein A5 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 478:1173-1178. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.087

Lin MJ, Dai W, Scott MJ, Li R, Zhang YQ, Yang Y, Chen LZ, Huang XS. 2017. Metformin improves nonalcoholic fatty liver disease in obese mice via down-regulation of apolipoprotein A5 as part of the AMPK/LXR α signaling pathway. *Oncotarget.* 8:108802-108809

LiverTox. 2020. Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Metformin. [Updated 2020 Jan 21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548726/> Accessed 30 Mar 2020

Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, Prigaro BJ, Wood JL, Bhanot S, MacDonald MJ, Jurczak MJ, Camporez JP, Lee HY, Cline GW, Samuel

- VT, Kibbey RG, Shulman GI. 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 510(7506):542-6. doi: 10.1038/nature13270
- Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, de Cabo R. 2013. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*. 4:2192. doi: 10.1038/ncomms3192
- Meng XM, Ma XX, Tian YL, Jiang Q, Wang LL, Shi R, Ding L, Pang SG. 2017. Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 21(9):2232-2237
- Ng W, Lobach AR, Zhu X, Chen X, Liu F, Metushi IG, Sharma A, Li J, Cai P, Ip J, Novalen M, Popovic M, Zhang X, Tanino T, Nakagawa T, Li Y, Uetrecht J. 2012. Animal models of idiosyncratic drug reactions. *Adv Pharmacol*. 63:81-135. doi:10.1016/B978-0-12-398339-8.00003-3
- Rena G, Hardie DG, Pearson ER. 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 60(9):1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R. 2019. Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 157:107843. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843
- Soliman HM, Wagih HM, Algaidi SA, Hafiz AH. 2013. Histological evaluation of the role of atypical antipsychotic drugs in inducing non-alcoholic fatty liver disease in adult male albino rats (light and electron microscopic study). *Folia biol*. 59(5): 173
- Song YM, Lee YH, Kim JW, Ham DS, Kang ES, Cha BS, Lee HC, Lee BW. 2015. *Autophagy*. 11(1):46-59
- Tang X, Li J, Xiang W, Cui Y, Xie B, Wang X, Xu Z, Gan, L. 2016. Metformin increases hepatic leptin receptor and decreases steatosis in mice. *J Endocrinol*. 230(2):227-37. doi: 10.1530/JOE-16-0142.
- Uetrecht J, Naisbitt DJ. 2013. Idiosyncratic adverse drug reactions: current concepts. *Pharmacol Rev*. 65(2):779-808. doi:10.1124/pr.113.007450
- Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Gulsen K, Dagalp K. 2004. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 19(5): 537-544
- Wang YW, He SJ, Feng X, Cheng J, Luo YT, Tian L, Huang Q. 2017. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther*. 22(11):2421-2429. doi: 10.2147/DDDT.S141675
- Zheng L. 2016. Metformin as a Rare Cause of Drug-Induced Liver Injury, a Case Report and Literature Review. *Am J Ther*. 23(1):315-7. doi:10.1097/MJT.000000000000007
- Zhou J, Massey S, Story D, Li L. 2018. Metformin: An Old Drug with New Applications. *Int J Mol Sci*. 19(10):2863. doi: 10.3390/ijms19102863



Abiyotik Strese Karşı Tohuma Manyetik Alan Uygulaması: Manyetoşartlandırma

Uğur Sevilmiş^{1*}, Deniz Sevilmiş², Mehmet Emin Bilgili¹

¹Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Adana, Türkiye

²Yağlı Tohumlar Araştırma Enstitüsü, Osmaniye, Türkiye

* Corresponding author : sevilmissugur@yahoo.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-3820-8387>

Received : 30/10/2019
Accepted : 12/04/2020

Özet: Abiyotik stres faktörleri, tohum çimlenmesi ve erken fide büyümesi gibi bitki büyümesinin kritik aşamalarında tarımsal üretim sistemlerine önemli etkiler yaparak verim üzerinde olumsuz etkiler yapmaktadır. Bu problemi çözmek için tohumlara ekim öncesi uygulanan kimyasal ve fiziksel işlemler, tuzluluk ve kuraklık koşulları altında çimlenme hızını arttıran ve eşzamanlı çıkışı sağlayan ümitvar bir tarımsal stres yönetim tekniği olarak hızla gelişim göstermektedir. Tohumlara uygulanan fiziksel yöntemlerden biri olan manyetik alan uygulaması, stresli çevresel koşullara karşı tarımsal ürünlerin toleransını artıran bir uygulama olarak son yıllarda öne çıkmaktadır. Uygulanan manyetik alan, tohumlarla etkileşime girmekte, metabolizmayı hızlandırmakta, sonuçta çimlenme, birincil ve ikincil metabolitlerin aktivasyonu, enzim aktiviteleri, besin ve su alımını iyileştirmektedir. Sonuçta manyetik alan uygulamaları sadece bitki büyüme ve gelişmesinin erken dönemlerinde değil tüm gelişim süreci boyunca bitkilere olumlu etki etmektedir. Bu derlemede, bu konuda yapılmış uluslararası alandaki az sayıdaki çalışma biraraya getirilmiş ve incelenmiştir.

Keywords: Manyetik alan, manyetoşartlandırma, tohum, abiyotik stres, çimlenme

Magnetic Field Application to Seeds Against Abiotic Stress: Magnetopriming

Abstract: Abiotic stress factors have important effects on agricultural production systems especially during critical stages of plant growth such as seed germination and early seedling growth which have a reducing effect on yield. To solve this problem, chemical and physical applications to the seeds before planting are rapidly developing solutions as a promising agricultural stress management technique that increases the rate of germination and emergence under salinity and drought conditions. Magnetic field application, which is one of the physical methods applied to the seeds, is becoming prominent in recent years that increases the tolerance of crops against stressful environmental conditions. The applied magnetic field interacts with the seeds, accelerates metabolism, improves germination, activate primary and secondary metabolites, enzyme activities and nutrient and water uptake. As a result, magnetic field applications have positive effects on plants not only in the early stages of plant growth and development but also throughout the entire lifecycle of crops. In this review, a limited number of international studies on this subject were clustered and analysed.

Anahtar Kelimeler: Magnetic field, magnetopriming, seed, abiotic stress, germination

1. Giriş

Abiyotik stres faktörleri, küresel olarak, sürdürülebilir tarımsal üretimin önünde büyük engel teşkil etmektedir. Tohum çimlenmesi ve erken dönemde fide büyümesi, stres koşullarında bitki büyümesinin en kritik aşamaları olarak kabul edilmektedir (Anand, 2014). Bu stres faktörlerinden biri olan toprak tuzlanması, kurak ve yarı kurak bölgelerde tarımsal üretimde büyük bir problem teşkil etmektedir. Tuzlu bölgelerde tuza dayanıklı türlerin veya çeşitlerin tespiti ve kullanımının yanı sıra, tuz stresinin etkilerini hafifletecek tohum uygulamalarının kullanılması, bu gibi

olumsuz koşullarda tarımsal üretimin sürdürülebilirliği için umut verici bir çözümdür (Costa ve ark., 2018). Ekim sonrası tuz stresine maruz kalacak bitki tohumlarına kimyasal, biyolojik ve fiziksel şartlandırma işlemleri başarıyla uygulanmaktadır. Bu uygulamalar, tohumun veya bitkinin tuza maruz kaldıktan sonra daha hızlı ve uygun tepki vermesini sağlayan fizyolojik ve moleküler yolları aktive edebilmektedirler (Costa ve ark., 2018). Tohuma ekim öncesi yapılan şartlandırma uygulamaları, çimlenme hızını arttıran ve böylece eşzamanlı çıkışı sağlayan ümit verici bir tarımsal stres yönetim tekniği olarak oldukça gelişim göstermeye başlamıştır. Tohumların sürme gücü,

önemli bir tohum kalite parametresidir ve tarımsal üretimde önemli bir rol oynamaktadır. Genelde hasat ve depolama sırasında da tohum kalitesi bir miktar düşer ve bir ekonomik kayıp ortaya çıkar. Uygun tarla yönetim stratejilerinin yanı sıra, çeşitli tohum hazırlama teknikleri tohum kalitesini iyileştirilebilir kapasitesindedir (Khan ve ark., 2017). Tohum teknolojisi açısından genelde bitkisel üretimde verimi arttırmak için kullanılan fiziksel yöntemler, kimyasal madde kullanan geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında avantajlara sahiptir. Tohumların sürme gücünü arttırmaya yönelik fiziksel yöntemler, gen ifadesindeki değişiklikleri, yapısal ve morfolojik değişimleri ve metabolit veya protein birikimini etkileyerek iyileştirme sağlarlar. Tohumlara ekim öncesi uygulanan fiziksel yöntemler, mikrodalga ile ışınlama, iyonize edici radyasyon uygulama ve manyetoşartlandırmadır (magnetopriming) (Rehman ve ark., 2019).

Manyetoşartlandırma (tohumların manyetik alana maruz bırakılması), abiyotik stres altında tohumların sürme gücünü geliştiren ve bitki standının düzgün oluşmasına yardımcı olan bir fiziksel uyarıcı özelliği göstermektedir (Anand, 2014). Manyetoşartlandırma, topraktaki kuraklık ve tuz gibi abiyotik stres koşullarında, bitkilerde bulunan antioksidanları artırıp oksidatif stresi azaltarak stresin olumsuz etkilerini azaltmaktadır (Radhakrishnan, 2019). Dünyanın manyetik alanı, çevrenin doğal bir bileşenidir ve bitkiler dahil canlı organizmalar için kaçınılmaz bir çevresel faktördür. Dünya yüzeyindeki jeomanyetik alanın yoğunluğu, ekvatorda 35 μ T (mikro Tesla), kutuplarda 70 μ T civarındadır. Manyetik ortamdaki değişim bitkilerin gelişimini de değiştirebilir (Guruprasad ve ark., 2016).

2. Tarla Bitkileri Alanında Yapılmış Çalışmalar

Anand, (2014), mısır, buğday ve nohut üzerinde, su eksikliği ve tuzluluk altında manyetoşartlandırma denemeleri yapmış, tohumun su emme özelliklerinin iyileştiğini, fide çimlenme gücünün artarak tohumların daha hızlı çimlendiğini tespit etmiştir. Tohumları manyetoşartlandırılmış olan ve her iki büyüme koşulunda da daha hızlı çimlenmekte olan fidelerde gözlemlendiği artan hidrojen peroksit seviyelerinin, manyetoşartlandırmanın tohum çimlenme sürecinde oksidatif sinyal düzeyindeki rolünü ortaya koyduğunu bildirmiştir. Kontrollü koşullarda yürüttüğü denemelerde, yüksek fotosentetik verim ve Na^+ 'nın dengeli bir şekilde dağıtılması, manyetoşartlandırılmış tohumlardan tuzluluk altında elde edilen verimin artması ile sonuçlandığını tespit etmiştir.

Rathod ve Anand, (2016), tuza duyarlı olan HD 2967 ve tuza toleranslı olan Kharchia 65 buğday (*Triticum aestivum* L.) genotiplerinin tohumlarını, 50 mT (2 saat) statik manyetik alana maruz bırakmış ve fide aşamasından oluma kadar bitkileri tuz stresine (150 mM NaCl) maruz bırakmıştır. Manyetoşartlandırma, hem tuzsuz hem de tuzlu koşullarda her iki genotipin bitki boyu, yaprak alanı ve kuru biyomas ağırlığında önemli artışlar yapmıştır. Tuz stresi altında, manyetoşartlandırma uygulanan tohumlardan elde edilen bitkilerdeki tüm bitki parçalarında Na^+ / K^+ oranı, kontrole kıyasla daha düşük olmuştur. Tuzlu koşullarda, tuza dayanıklı olan çeşit, elektoroşartlandırma

uygulanmasından, hassas olandan daha fazla fayda sağlamış ve manyetoşartlandırma yapılmayan ve tuzsuz koşullarda yetiştirilen bitkiler kadar verim vermiştir.

Balakhnina ve ark., (2015), buğday (*Triticum aestivum* L.) tohumlarına 30 mT, 50 Hz, 30 s manyetik alan uygulamasının (+MF) su basması koşullarında (FI) yetiştirilen tohumların çimlenmesi, fide büyüme oranı ve bitki toleransına etkisini araştırmışlardır. MF, toprağın optimum sulanması durumunda büyüme süreçlerini uyarmamıştır. Oksidatif işlemlerin yoğunluğunu yansıtan tiyobarbitürik asit miktarı, MF uygulanmış tohumlardan elde edilmiş bitkilerin yapraklarında uygulanmamış bitkilerinden daha düşük olmuştur. Tohumlara 30 mT, 50 Hz, 30 s manyetoşartlandırma uygulaması, su basması altında buğday tohumlarının çimlenmesini ve büyümesini teşvik etmemiş ancak bitki antioksidan potansiyelinin artmasına neden olmuştur.

Shine ve ark., (2017), tohumların biyostimülasyonu amacıyla sabit manyetik alan uygulamasının mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) ortaya çıkardığı fizyokimyasal değişiklikleri laboratuvar koşullarında incelemiştir. Manyetoşartlandırma sonrası, çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı, fide uzunluğu, taze ağırlığı, kuru ağırlığı ve sürme gücü indeksleri gibi çimlenme ile ilgili parametrelerde iyileşmeler tespit etmişlerdir. Fide uzunluğu ve sürme gücü, manyetoşartlandırma sonrası en fazla iyileşen parametreler (sırasıyla % 72 ve % 59) olmuştur. Reaktif oksijen türlerindeki değişimini anlamak için iki doz (60 dakika boyunca 200 mT ve 120 dakika boyunca 100 mT) kullanılarak bir aşama ileri bir çalışma daha yürütmüşlerdir. Elde edilen sonuçlar, manyetoşartlandırmanın, tohum çimlenmesi için bir biyostimulant olarak etkili bir şekilde kullanılabileceğini ve etkisinin, reaktif oksijen türleri bağlamında biyokimyasal olarak tanımlanabildiğini göstermiştir.

Javed ve ark., (2011), ekim öncesi tohumlara farklı düzeyde manyetoşartlandırma uygulamasının mısır bitkilerinde büyüme, klorofil pigmentleri, fotosentez, su ilişki özellikleri, floresans ve ozmoprotektan seviyeleri üzerine etkilerini normal ve kuraklık stresi koşullarında test etmişlerdir. İki mısır çeşidinin tohumlarını, farklı manyetoşartlandırma ($T_0 = 0$ mT; $T_1 = 100$ mT, 5 dakika; $T_2 = 100$ mT, 10 dakika; $T_3 = 150$ mT, 5 dakika ve $T_4 = 150$ mT, 10 dakika) ile muamele etmişlerdir. Manyetik ön işlemden geçirilmiş tohumlardan elde edilmiş bitkilerde klorofil a, A, E, gs, Ci ve fotokimyasal su verme ve fotokimyasal olmayan su verme işlemleri iyileşmiş, bu durum, kuraklığa bağlı olumsuz etkilerin büyüme üzerindeki etkilerini önemli ölçüde hafifletmiş, diğer özellikler üzerinde ise önemli bir etki göstermemiştir. Tüm manyetoşartlandırma uygulamalarının kuraklığın olumsuz etkilerini azaltmada faydalı olduğu görülmüş, en etkili uygulama olarak 10 dakika boyunca 100 ve 150 mT uygulaması bulunmuştur.

Baghel ve ark., (2019), tuz stresinin mısır tohumunun çimlenmesi, bitkilerin büyümesi, fotosentezi ve verimi üzerindeki zararlı etkilerinin azaltılmasında manyetoşartlandırma kullanımının etkinliğini incelemiştir.

Bu amaçla mısır tohumlarını 1 saat süresince 200 mT statik manyetik alana (SMF) tabi tutmuşlardır. Manyetoşartlamadan geçirilmiş mısır tohumları, tuzlu ve tuzsuz koşullarda, uygulama yapılmamış tohumlara kıyasla nispeten daha yüksek çimlenme yüzdesi ve çimlenme stresi tolerans indeksi göstermişlerdir. Tohumlara uygulama yapılması, yapılmamasına kıyasla, farklı tuz stresi altında NaCl (0, 25, 50, 75 ve 100 mM) fide kuvveti, bitki boyu, yaprak alanı ve biyokütle oluşumu gibi büyüme parametrelerini iyileştirmiştir. Fotosentetik pigmentler, PSII'nin fotokimyasal kuantum verimi (Fv / Fm), yaprak başına elektron taşınımı (ETo / CSm) ve reaksiyon merkezlerinin yoğunluğu (RC / CSm) uygulama sayesinde yükselmiştir. SMF uygulamasının bu uyarıcı etkisi, fotosentez ve stoma iletkenliği oranında da gözlemlenmiş ve bu, tuz stresi altında mısır bitkilerinin veriminin artmasıyla sonuçlanmıştır. Tuz toleransının geliştirilmesi için, mısır tohumlarının 1 saat boyunca 200 mT manyetik alan ile manyetoşartlandırılması etkili bir uygulama olarak tespit edilmiştir.

Baghel ve ark., (2016), manyetoşartlandırmanın soya (*Glycine max* L.) bitkisinin büyümesi üzerindeki tuz kaynaklı yan etkileri hafifletmedeki etkinliğini araştırmışlardır. Soya tohumlarını 1 saat boyunca 200 mT statik manyetik alana maruz bırakmışlar, uygulamanın büyüme, karbon ve azot metabolizması ve tohum verimi üzerindeki etkilerini farklı tuzluluk seviyelerinde (0, 25 ve 50 mM NaCl altında) değerlendirmişlerdir. Manyetoşartlandırma işlemi, muamele edilmemiş tohumlara kıyasla hem tuzsuz hem de tuzlu koşullar altında bitki büyüme özelliklerini, kök nodül sayısını, nodül taze ağırlığını, bitki biyokütle üretimi ve fotosentetik performansını önemli ölçüde arttırmıştır. Nitrat redüktaz aktivitesi, fotosentetik pigmentler ve net fotosentez oranı, uygulama yapılmamış tohumlara kıyasla uygulama yapılmış tohumlardan elde edilen bitkilerde daha yüksek olmuştur. Uygulama yapılması, kök nodüllerindeki hemechrome ve leghemoglobin içeriğini de arttırmıştır, ayrıca karbon ve azot metabolizması, soya verimi, bakla sayısı, tohum sayısı ve tohum ağırlığını tuzlu koşullar yanında tuzsuz koşullarda da arttırmıştır. Sonuç olarak, manyetoşartlandırma uygulaması, NaCl'nin soya üzerindeki olumsuz etkilerini etkili bir şekilde hafifletmiştir.

Kataria ve ark., (2019), yürüttükleri tarla denemesinde, tohumlarına 1 saat boyunca 200mT statik manyetik alan uyguladıkları soyada, tuz stresi altında büyüme, azot fiksasyonu, fotosentez, antioksidan sistem ve verimi incelemişlerdir. Tohuma manyetoşartlandırma uygulamasıyla, kontrole kıyasla yaprak alanı, özgül yaprak ağırlığı, fotosentez, nitrojenaz aktivitesi önemli derecede artarken; H₂O₂, askorbik asit ve antioksidan enzimler önemli ölçüde azalmış ve sonuçta, hem tuzlu hem de tuzsuz koşullar altında soyanın biyokütle üretimi, verimi ve hasat indeksi değerleri iyileşmiştir.

Hozayn ve Ahmed, (2019), triptofan veya askorbik asit ile birlikte uygulanan manyetoşartlandırmanın, tuzluluk altında (2000, 4000, 6000 ve 8000 ppm) çimlenen arpa (*Hordeum vulgare* L.) tohumlarının tuza tepkisini değiştirip değiştiremeyeceğini araştırmışlardır. Manyetoşartlama

uygulanmış tohumları, triptofan veya askorbik asit içeren çözeltiler ile sulamışlardır. Manyetoşartlanmayan tohumları kontrol olarak almışlardır. Çimlenme parametreleri, farklı tuzluluk seviyelerinde manyetoşartlandırma uygulamasıyla iyileşmiştir. Triptofan ve askorbik asit ile birlikte manyetoşartlanma uygulanan tohumların çimlenmesi ve tohum canlılığı, farklı tuzluluk seviyelerinde daha yüksek değerler vermiştir. Ayrıca bazı enzim, peroksidaz, polifenoloksidaz ve kitinaz aktiviteleri de önemli ölçüde artmıştır. Tuzluluk altında fide büyümesi sırasında, manyetoşartlandırılmış tohumlar 6000 ppm'e kadar tuz altında bu enzimlerin birikimini önemli ölçüde arttırmıştır.

Thomas ve ark., (2013), manyetoşartlamanın tuzlu koşullar altında nohut (*Cicer arietinum* L.) tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için Pusa 1053 (Akdeniz tipi) ve Pusa 256 (yerli) nohut tohumlarına 1 saat boyunca 100 mT statik manyetik alan uygulamışlardır. Kök ve sürgün uzunluğu ve sürme gücü ölçümleri manyetoşartlandırmanın tuz stresini azaltmada etkili olduğunu ve bu uygulamanın Pusa 256 çeşidine kıyasla Pusa 1053 çeşidinde daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmanın sonucunda, kuru nohut tohumlarına manyetoşartlandırma uygulayarak, nohutta erken dönem tuz stresinin olumsuz etkilerinin azaltılabileceğini tespit etmişlerdir.

Mridha ve ark., (2016), tohumları ekim öncesi statik manyetik alanla muamele edilen nohutta, su stresi altında, ışık kullanım etkinliği ve su kullanım etkinliğindeki değişimi araştırmışlardır. Denemeleri sera ve açık tarla koşullarında desi ve kabulü tipi genotipler ile yapmışlardır. Uygulamaya maruz kalan tohumlar (100 mT, 1 saat), kök hacminde ve yüzey alanında sırasıyla %70 ve %65 oranında artış göstermiştir. Uygulama, bitkilerin, toprak nemi kaybolmadan, aktif büyüme döneminde (ekimden 78-118 gün sonra) %60 daha yüksek nem çekmesini sağlamıştır. Uygulama yapılan her iki genotip de daha iyi su kullanım etkinliği, biyokütle ve radyasyon kullanım etkinliğine sahip olmuştur.

Janalizadeh ve ark., (2017), manyetoşartlandırmanın susam (*Sesamum indicum* L.) tohumunun çimlenmesi üzerine etkisini su stresi koşulları altında araştırmışlardır. Manyetik alana maruz bıraktıkları kuru susam tohumlarını (kontrol-manyetoşartlandırma yok, 10 dakika boyunca 25 mT ve 60 dakika boyunca 75 mT manyetoşartlandırma), daha sonra farklı potansiyellerde (kontrol-distile su, -2, -4, -6 ve -8 bar) polietilen glikol 6000 (PEG6000) ile muamele etmişlerdir. Uygulamalar sonucunda manyetoşartlandırmanın çimlenme oranı, kök uzunluğu, kök kuru ağırlığı ve fide uzunluğu ile fide ağırlığı canlılık endekslerinde, özellikle kontrol işlemine kıyasla yüksek su stresi düzeylerinde, artışa neden olduğunu göstermişlerdir.

3. Bahçe Bitkileri Alanında Yapılmış Çalışmalar

Bhardwaj ve ark., (2012), salatalık (*Cucumis sativus*) tohumlarını 1, 2 ve 3 saat boyunca 100 ila 250 mT arasında statik manyetik alan kuvvetine maruz bırakmışlardır. Manyetoşartlandırma yapılan tohumların yapılmayanlara kıyasla çimlenme yüzdesi %18.5, çimlenme oranı %49.0,

fide uzunluğu %34.0 ve kuru ağırlığı %33.0 artmıştır. Farklı manyetik alan dozları arasından, 1 saat boyunca 200 mT manyetoşartlandırma uygulaması, çimlenme parametreleri üzerinde önemli bir etki göstermiştir. Bu uygulama, çimlenen tohumların su alımını, hidrolitik enzimler, reaktif oksijen türleri ve antioksidan enzim sistemindeki değişiklikleri incelemek için seçilmiş ve ileri incelemeye tabi tutulmuştur. Tohumların şişmesi sürecinde su alma değerleri, kontrole kıyasla, uygulamanın yapıldığı tohumlarda daha yüksek bulunmuştur. Hidrolitik enzimler olan amilaz ve proteazın aktiviteleri, uygulama yapılmayan kontrolden sırasıyla %51 ve %13 oranında daha yüksek olmuştur. Yine kontrole kıyasla uygulama yapılan tohumlarda, süperoksit radikalleri %40, hidrojen peroksit %8 artarken antioksidan enzimlerinden süperoksit dismutaz %8, katalaz %83 ve glutation redüktaz %77 artış göstermiştir. Salatalık bitkisinin kuru tohumlarının manyetoşartlandırılması uygulamasının tohumların çimlenme gücünü artırmada kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Diğer şartlandırma metodlarından farklı olarak manyetoşartlandırmanın uygulama sonrası kurutma gerektirmemesinin kolayca depolanma avantajı da sağladığı bildirilmiştir.

Touati ve ark., (2013), laboratuvar koşullarında, iki turp (*Raphanus sativus*) çeşidinin (Kırmızı: RR, Kırmızı-Beyaz:R+W) tohumlarına manyetoşartlandırma uygulamasının (100 ve 200 mT), farklı uygulama sürelerinde (2 ve 3 saat) fidelerin büyümesi ve oksidatif durumu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 3 saat uygulanan 100 mT manyetoşartlandırma uygulaması, 8 günlük fidelerin biyokütlesinin kontrole kıyasla RR için %26, R+W için %29 artmasına yol açmıştır. Bunun yanı sıra turp bitkilerinde katalaz aktivitesi önemli ölçüde artmıştır (kotiledonlarda yaklaşık %36). Bununla birlikte, asimilasyon pigmentleri önemli ölçüde azalmış (yaklaşık %25), ancak malondialdehit içeriği değişmeden kalmıştır. Sonuç olarak, turp tohumlarına ekim öncesi 100 mT / 3 saat manyetoşartlandırma uygulaması, iyi bir oksidatif durum oluşturup bitkilerin erken dönem gelişimini iyileştirmiştir.

Bukhari ve ark., (2019), kudret narı (*Momordica charantia* L.) tohumlarına 5 saniye boyunca 50 mT gücünde manyetik alan uygulamıştır. Uygulama, çimlenme yüzdesini, büyümeyi, yaprak klorofil miktarını, antimikrobiyal aktiviteyi, amino asit ve fenolik miktarını artırırken, meyve besin değeri üzerinde ihmal edilebilir bir etki yapmıştır.

Razmjoo ve Alinian, (2017) tarafından, kimyon tohumları (*Cuminum cyminum* L.) 1 dakika boyunca 0, 150 mT, 250 mT, 500 mT ve 1 T manyetik alan kuvvetiyle muamele edilmiş ve çimlenme parametreleri incelenmiştir. Tüm manyetoşartlandırma işlemleri, kontrol ile karşılaştırıldığında, çimlenme parametrelerini ve fide büyümesini geliştirmiştir. 500 ve 150 mT en etkili uygulamalar olarak öne çıktığından bu uygulamaları tarla çalışmaları için seçmişlerdir. Tohumları 12 dakika boyunca 150 mT ve 500 mT statik manyetik kuvvet alanlarına maruz bırakmış ve tarlaya dikmişlerdir. Statik manyetik alan uygulaması fidelerin çıkış, çiçeklenme ve olgunlaşma

sürelerini kısaltmış, klorofil miktarını artırmış ve prolin içeriğini azaltmıştır. En yüksek biyolojik verim, tohum verimi, uçucu yağ verimi, yağ içeriği ve esansiyel yağ verimi, sırasıyla 500 mT, ardından 150 mT ve kontrol altında kaydetmişlerdir.

Isaac Alemán ve ark., (2014) tarafından, çok düşük frekanslı elektromanyetik alanların kahve fidelerinde net fotosentez, transpirasyon, fotosentetik pigment konsantrasyonu ve ribüloz 1,5 bisfosfat karboksilaz / oksijenaz (RBCS1) gen ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemişlerdir. İşlem görmemiş kahve bitkilerini kontrol olarak alıp, diğer bitkileri 3 dakika boyunca 2 mT gücünde 60 Hz'lik sinüzoidal manyetik alana maruz bırakılmışlardır. Manyetik uygulamaya maruz kalmış bitkilerde net fotosentez ve fotosentetik pigment konsantrasyonunda önemli bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, kontrol bitkilerine göre, RBCS1 gen ekspresyonu artmış (yaklaşık iki kat) ve transpirasyon hızı düşüş göstermiştir. Sonuç olarak, bulgular, 60 Hz'lik manyetik alanın kahve bitkilerine in vitro uygulanmasının, bazı fotosentetik, fizyolojik ve moleküler faaliyetlerde değişiklik yaparak, canlılıklarını arttırabildiğini ve daha geç gelişim aşamalarında daha iyi bir bitki gelişimi sağlayarak fide kalitesini iyileştirebileceğini göstermiştir.

Mohammadi ve ark., (2016), manyetoşartlandırmanın normal durumda ve ozmotik stres altında, şifalı bitki olan Zufa otu (*Hyssopus officinalis* L.) tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Farklı sürelerde (5, 10, 20 ve 30 dakika) manyetik alan ile (45, 90, 200, 250 mT) şartlandırılmış tohumlar, normal şartlarda veya mannitol kullanımıyla oluşturulmuş ozmotik stres altında (100, 200, 300 mM) petri kaplarında çimlendirilmiş ve 10 gün boyunca büyütülmüştür. 200mT / 5dk manyetik alan uygulaması, normal koşullarda çimlenme oranını %15, tohum canlılık indeksini %42 arttırmıştır. Manyetoşartlandırma uygulaması, osmotik stres altında tohum çimlenme yüzdesini %14 oranında arttırmıştır.

4. Sonuç

Uluslararası literatürde, tarla bitkileri (buğday, mısır, arpa, soya, nohut ve susam), bahçe bitkileri (salatalık, turp ve kahve) ve tıbbi aromatik bitkiler (kudret narı, kimyon ve zufa otu) üzerinde farklı türlerde yapılmış olan kısıtlı sayıda manyetoşartlandırma çalışması tespit edilmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde manyetoşartlandırmanın, su kısıtı ve tuz stresi koşullarında tohumun su emme, çimlenme gücü, çimlenme süresi, kök hacmi, yüksek fotosentetik düzey, bitki boyu, yaprak alanı, kuru ve yaş biyomas ağırlığı, su kullanım etkinliği ve tohum verimini iyileştiren bir biyostimulant görevi görmekte olduğu görülmektedir. Abiyotik stres altında bu etkinin reaktif oksijen türleri bağlamında etki gösterdiği tahmin edilmektedir. Bir baklagil olan soyada yapılmış olan uygulamalarda nodül sayısı, ağırlığı ve aktivitesini iyileştirdiği görülmektedir. Diğer şartlandırma metodlarından farklı olarak manyetoşartlandırmanın uygulama sonrası kurutma gerektirmemesinin tohumları kolayca depolanma avantajı sağladığı da görülmektedir. Bu uygulamalar konusunda

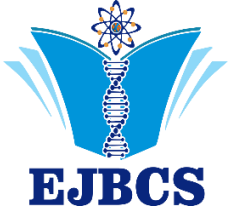
daha fazla sayıda türle ve farklı koşullarda farklı araştırmacılarla daha çok sayıda çalışmanın yapılmasıyla konunun daha detaylı olarak ortaya konması sağlanabilecektir. Ülkemizde de bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Conflict of interest disclosure:

Authors declare no conflict of interest.

References

- Anand A 2014. Magnetopriming-an alternate strategy for crop stress management of field crops. In Proceedings of the international conference on radiation biology: frontiers in radiobiology-immunomodulation, countermeasures and therapeutics: abstract book, souvenir and scientific programme 46(1): 71.
- Baghel L, Kataria S, Guruprasad KN 2016. Static magnetic field treatment of seeds improves carbon and nitrogen metabolism under salinity stress in soybean. *Bioelectromagnetics* 37(7): 455-470.
- Baghel L, Kataria S, Jain M 2019. Mitigation of adverse effects of salt stress on germination, growth, photosynthetic efficiency and yield in maize (*Zea mays* L.) through magnetopriming. *Acta Agrobot* 72(1).
- Balakhmina T, Bulak P, Nosalewicz M, Pietruszewski S, Włodarczyk T 2015. The influence of wheat *Triticum aestivum* L. seed pre-sowing treatment with magnetic fields on germination, seedling growth, and antioxidant potential under optimal soil watering and flooding. *Acta physiol plant* 37(3): 59.
- Bhardwaj J, Anand A, Nagarajan S 2012. Biochemical and biophysical changes associated with magnetopriming in germinating cucumber seeds. *Plant Physiol Bioc* 57: 67-73.
- Bukhari SA, Farah N, Mustafa G, Mahmood S, Naqvi SAR 2019. Magneto-Priming Improved Nutraceutical Potential and Antimicrobial Activity of *Momordica charantia* L. Without Affecting Nutritive Value. *App Biochem Biotech* 188(3): 878-892.
- Costa SF, Martins D, Agacka-Moldoch M, Czubacka A, de Sousa Araújo S 2018. Strategies to Alleviate Salinity Stress in Plants. In *Salinity Responses and Tolerance in Plants, Volume 1* (pp. 307-337). Springer, Cham.
- Guruprasad KN, Shine MB, Joshi J 2016. *Impact of Magnetic Field on Crop Plants*. Publisher: Breeding and Genetic Engineering: The Biology and Biotechnology Research.
- Hozayn M, Ahmed AA 2019. Effect of Magneto-priming by tryptophan and ascorbic acid on germination attributes of barley (*Hordeum vulgare*, L.) under salinity stress. *Eurasia J Biosci* 13(1): 245-251.
- Isaac Alemán E, Oliveira Moreira R, Almeida Lima A, Chaves Silva S, González-Olmedo JL, Chalfun-Junior A 2014. Effects of 60 Hz sinusoidal magnetic field on in vitro establishment, multiplication, and acclimatization phases of *Coffea arabica* seedlings. *Bioelectromagnetics* 35(6): 414-425.
- Janalizadeh GM, Nezami A, Khazaie HR, Goldani M, Feizi H 2017. Effect of magneto priming on seed germination of sesame (*Sesamum indicum*) seed under water stress conditions. *Iranian J Seed Res* 6(1): 165-176
- Javed N, Ashraf M, Akram NA, Al-Qurainy F 2011. Alleviation of adverse effects of drought stress on growth and some potential physiological attributes in maize (*Zea mays* L.) by seed electromagnetic treatment. *Photochem Photobiol* 87(6): 1354-1362.
- Kataria S, Baghel L, Jain M, Guruprasad KN 2019. Magnetopriming regulates antioxidant defense system in soybean against salt stress. *Biocatal Agric Biotechnol* 18, 101090.
- Khan FA, Bhat SA, Narayan S, Maqbool R, Murtuza I, Khan FU 2017. Seed deterioration and priming-An Overview. *SKUAST J Res* 19(1): 12-21.
- Mohammadi R, Roshandel P, Tadayon A 2016. The Effect of magnetopriming on seed germination of *Hyssopus officinalis* under osmotic stress. *Iranian Journal of Seed Science and Research* 3(1): 99-109.
- Mridha N, Chattaraj S, Chakraborty D, Anand A, Aggarwal P, Nagarajan S 2016. Pre-sowing static magnetic field treatment for improving water and radiation use efficiency in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under soil moisture stress. *Bioelectromagnetics* 37(6): 400-408.
- Radhakrishnan R 2019. Magnetic field regulates plant functions, growth and enhances tolerance against environmental stresses. *Physiol Mol Biol Pla* 1-13.
- Rathod GR, Anand A 2016. Effect of seed magneto-priming on growth, yield and Na/K ratio in wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *Indian J Plant Physi* 21(1): 15-22.
- Razmjoo J, Alinian S 2017. Influence of magnetopriming on germination, growth, physiology, oil and essential contents of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Electromagn Biol Med* 36(4): 325-329.
- Rehman A, Mazhar K, Ijaz M, Ali Q, Ahmad S 2019. Seedling Pretreatment: Methods and Protocols. In *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings* (pp. 117-134). Springer, Singapore.
- Shine MB, Kataria S, Guruprasad KN, Anjali A 2017. Enhancement of maize seeds germination by magnetopriming in perspective with reactive oxygen species. *J Agric Crop Res* 5(4): 66-76.
- Thomas S, Anand A, Chinnusamy V, Dahuja A, Basu S 2013. Magnetopriming circumvents the effect of salinity stress on germination in chickpea seeds. *Acta Physiol Plant* 35(12): 3401-3411.
- Touati MA, Boughanmi NG, Salem MB, Haouala R 2013. Effects of moderate static magnetic field presowing treatment on seedling growth and oxidative status in two *Raphanus sativus* L. varieties. *Afr J Biotechnol* 12(3).



Ruminantlarda Tildipirosin Kullanımı

Devran Coşkun¹ , Enver Yazar^{2,*} 

¹Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye
²Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

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

Received : 23/03/2020
Accepted : 27/05/2020

Özet: Ruminantlarda solunum sistemi enfeksiyonları ciddi ekonomik kayıp ve ölüm nedenleri arasındadır. Hastalığın etkenleri olarak sıklıkla *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus somni* bulunur. Ruminantlarda en fazla antibiyotik, solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılır. Solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde farklı antibiyotik grupları kullanılabilir. Bu antibiyotikler arasında amfenikoller, florokinolonlar, sefalosporinler ve makrolidler bulunur. Veteriner hekimlikte makrolid grubu antibiyotik kullanımı özellikle solunum sistemi enfeksiyonları ve ayak enfeksiyonları tedavisinde tercih edilir. Makrolid grubu antibiyotiklerden tildipirosin sadece veteriner hekimlik için üretilmiştir ve sığır ile domuzlarda solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı onaylanmıştır. Bu derlemede tildipirosinin ruminantlarda etkinliği, klinikte kullanımı ve yan etkileri hakkında bilgiler verilmeye çalışılmıştır.

Keywords: Tildipirosin, makrolid, ruminant

Use of Tildipirosin in Ruminants

Abstract: Respiratory system infections in ruminants is among the causes of serious economic loss and death. The agents of the disease are often *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Histophilus somni*. In ruminants, antibiotics are mostly used for the treatment of respiratory system infections. Different antibiotic groups can be used in the treatment of respiratory system infections. These antibiotics include amphenicols, fluoroquinolones, cephalosporins and macrolides. In veterinary medicine, macrolide group antibiotics are especially preferred in the treatment of respiratory system infections and foot infections. Among the macrolide group antibiotics, tildipirosin is exclusively used in veterinary medicine and is approved for use in the treatment of respiratory infections in cattle and pigs. In this review, it has been tried to give information about the efficacy, clinical use and side effects of tildipirosin in ruminants.

Anahtar Kelimeler: Tildipirosin, makrolide, ruminant

© EJBCS. All rights reserved.

1. Giriş

Makrolid grubu antibiyotikler, 12 ile 16 üye arasında değişen lakton halkasını içeren atom sayısına göre sınıflandırılır. Veteriner hekimlikte ilk makrolid antibiyotik 1960'larda kullanılmaya başlanmıştır. 2011 yılında ise 16 üyeli makrolid grubu antibiyotik olan tildipirosinin veteriner hekimlikte kullanımı onaylanmıştır. Tildipirosin gibi yarı sentetik makrolid grubu antibiyotiğin düşük klerense sahip olmaları uzun etkili olmasını sağlamıştır (Pyorala ve ark., 2014). Tildipirosinin sığırlarda C_{max} düzeyinin 0.7 mcg/mL, t_{max} düzeyinin 23 dakika, yarı ömrünün 9 gün olduğu (Menge ve ark., 2012) ve akciğerlerde 3-4 haftaya kadar bulunabildiği bildirilmiştir (Pyorala ve ark., 2014). Sonuç olarak tildipirosinin solunum sistemine hızlı geçtiği ve vücuttan yavaş elimine edildiği ifade edilmiştir (Menge ve ark., 2012).

Tildipirosin (20,23-dipiperidinyl-mycaminosyl-tylonolide) tilozinden türetilen yarı sentetik makrolid grubu antibiyotiktir. İlacın etki spektrumu içinde domuzlarda solunum sistemi enfeksiyonu patojenleri olan *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* ile *Haemophilus parasuis* ve sığırlarda solunum sistemi patojenleri olan *Mannheimia haemolytica*, *P. multocida* ve *Histophilus somni* bulunur. Avrupa Birliği İlaç Ajansı (EMA), Türkiye'de de satışa sunulan tildipirosinin sığır (4 mg/kg, SC) ve domuzların (4 mg/kg, IM) solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde tek doz olarak kullanımını onaylanmıştır. İlaç etkisini bakterilerde ribozomal 50s alt üniteye bağlanarak protein sentezini engelleyerek gösterir. Sığırlarda önerilen dozun 10 katı ve domuzlarda 5 katı uygulamada ciddi toksikasyonlara neden olmadığı ifade edilmiştir. Bu hayvanlarda uygulama sonrası huzursuzluk, enjeksiyon

bölgesinde şişme ve kreatin kinaz düzeyinde artışlar gözlenmiştir (Yazar, 2018; EMA, 2020a; EMA, 2020b). Yapılan araştırmalarda *Pseudomonas aeruginosa* ve *Rhodococcus equi* etkenlerinin yeni nesil makrolidlere de dirençli olabileceği ifade edilmiştir (Anastasi ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2018).

Makrolid grubu antibiyotikler veteriner hekimlikte birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Yazar, 2019). Ancak son yıllarda gıda değeri olan hayvanlarda antibiyotiklerin özellikle metafilaksi ve profilaksi amaçlı kullanımının azaltılması için artan baskılar bulunmaktadır (Windeyer ve ark., 2017). Bu derlemenin devamında tildipirosinin profilaksi, metafilaksi ve tedavi amaçlı olarak kullanımı hakkında çalışmalar sunulacaktır. Ancak veteriner hekimliği dikkate alındığında minimal düzeyde antibiyotik kullanılması gerektiği ve antibiyotiklerin tek tedavi seçeneği olarak düşünülmesinin yanlış olduğu bilinmelidir. Gerçekte aynı işletmede sürekli antibiyotik kullanılması gerekiyorsa, öncelikli olarak yönetim problemleri gözden geçirilmelidir.

2.Sığırlarda Kullanımı

Sığır solunum sistemi enfeksiyonu (BRD, bovine respiratory disease) buzağı, dana ve özellikle besi sığırlarında ciddi enfeksiyon ve ölüm sebebidir (Lubbers ve Turnidge, 2015; Mates ve ark., 2016). *M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somni* ve *Mycoplasma* spp. sıklıkla hastalığın etkenleri olarak tanımlanmaktadır (Mates ve ark., 2016; Stanford ve ark., 2020). Ayrıca *Bovine herpesvirus*, *Bovine viral diarrhoea virus*, *Bovine respiratory syncytial virus* ve *Parainfluenza type 3 virus* bulunduğu durumlar kompleks sığır solunum sistemi enfeksiyonu (BRDC, Bovine respiratory disease complex) olarak ta tanımlanır. Aşı uygulamaları pratikte yapılsa da metafilaktik olarak antibiyotik kullanımı önerilmektedir. Metafilaktik antibiyotik kullanımı, bir hastalık salgını beklenildiğinde hastalığın ortaya çıkmasını önlemek için bir grup hayvana ilaç verilmesi olarak tanımlanır. Pratikte profilaksi ile arasında büyük ayrımlar bulunmamaktadır (O'Connor ve ark., 2018). BRD enfeksiyonlarının önlenmesinde makrolid grubu antibiyotiklerin etkili olabileceği ve tildipirosinin tercih edilebilecek makrolid grubu antibiyotik olabileceği ifade edilmiştir (O'Connor ve ark., 2016; O'Connor ve ark., 2019). Tildipirosinin *M. haemolytica*, *P. multocida* ve *H. somni*'ye karşı etkinliği bildirilmiştir (Mates ve ark., 2016). Besi sığırlarında (*H. somni*, *M. haemolytica*) metafilaksi amaçlı tildipirosin uygulamasının hastalık oranını düşürebileceği ifade edilmiştir (Magalhaes ve ark., 2017). Nakil kaynaklı BRD önlenmesinde tildipirosin veya tildipirosin + fluniks kombinasyonu uygulaması arasında mortalite ve morbidite oranları üzerinde fark olmadığı ifade edilmiştir (Martin ve ark., 2019). Yapılan başka bir araştırmada performans, sağlık ve aktivite açısından tildipirosin veya tildipirosin + fluniks kombinasyonu uygulaması arasında fark olmadığı bildirilmiştir (Martin ve ark., 2020). Ancak BRD etkenlerinin, yeni nesil makrolidlere de direnç geliştirebileceği rapor edilmiştir (Michael ve ark., 2012; Olsen ve ark., 2015).

Risk grubu olan buzağılara metafilaktik olarak farklı günlerde tildipirosin (4 mg/kg, SC) uygulaması sonrasında BRD oluşumu üzerine olumlu etkiler gösterebileceği ve stratejik olarak uzun etkili antibiyotiklerin metafilaksi amaçlı kullanılabilmesi ifade edilmiştir (Teixeira ve ark., 2017). Buzağılarda naklin olumsuz etkilerinin önlenmesi için yapılan araştırmada metafilaktik olarak 4 mg/kg (SC) tildipirosin uygulamasının canlı ağırlığı kısmen artırabileceği ifade edilmiştir (Hill ve ark., 2018). Tildipirosin ile tulatromisinin buzağılarda BRD hastalığı tedavisinde etkinliğinin karşılaştırıldığı araştırmada iki antibiyotik arasında fark olmadığı, metafilaktik olarak ikisinin de kullanılabilmesi ifade edilmiştir (Theurer ve ark., 2018). Sürü sağlığı açısından buzağılarda ölüm oranını düşürmek için satılan ticari ürünlerden profilaksi amaçlı 1 mL (SC) selenyum + vitamin E, 1 mL (SC) tildipirosin ve 8 mL halofuginon (PO, 6 gün) uygulaması yapılabileceği bildirilmiştir (Eckert ve ark., 2015). Ayrıca buzağılarda gözlenen BRD enfeksiyonlarının tedavisinde tildipirosinin meloksikamla birlikte kullanılabilmesi belirtilmiştir (Pardon ve ark., 2015). Yukarıda ifade edilen tildipirosinin etkileri ile ilgili araştırmaların tersine buzağılarda metafilaktik olarak kullanımının belirgin etkilere neden olamayabileceğini ifade eden araştırma da bulunmaktadır (Berman ve ark., 2017). Buzağılarda yapılan deneysel *M. bovis* enfeksiyonunda tulatromisin ile tildipirosinin etkinliğinin karşılaştırıldığı araştırmada, tulatromisinin daha düşük düzeyde akciğer lezyonları ve mortaliteye neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tulatromisinin depresyon süresini kısalttığı ve canlı ağırlık artışını daha fazla etkilediği bildirilmiştir. Sonuçta tildipirosinin, tulatromisine *M. bovis* enfeksiyonu açısından üstünlüğünün bulunmadığı ifade edilmiştir (Bartram ve ark., 2016).

Sığırlarda gözlenen digital dermatitis hastalığına spiroket türlerinin (*Treponema* spp.) neden olabileceği ifade edilmiştir (Akköse ve İzci, 2017). Yapılan *in vitro* teste *Treponema* spp. tildipirosine duyarlı olduğu belirlenmiştir (Angell ve ark., 2015).

3.Koyun ve Keçilerde Kullanımı

Koyunlarda solunum sistemi enfeksiyonunun temel etkenleri olarak *M. haemolytica*, *Bibersteinia trehalosi*, *P. multocida* ve *Mycoplasma ovipneumoniae* türleri bulunur (Wood ve ark., 2017; Politis ve ark., 2019). Bu hastalığın major etkenleri olan *Pasteurella* spp. ve *Mycoplasma* spp. karşı makrolid grubu antibiyotiklerin etkinliği bilinmesine rağmen (Politis ve ark., 2019), tildipirosinin koyunlarda ve keçilerde kullanımı onaylanmamıştır. Koyunlarda gözlenen contagious ovine digital dermatitis (CODD) etiyolojisinde spiroket türünden *Treponema* spp, *Dichelobacter nodosus* ve *Fusobacterium necrophorum* bulunabileceği bildirilmiştir. Keçilerde de ayak enfeksiyonlarında *Treponema* spp. rol alabileceği belirlenmiştir (Akköse ve İzci, 2017). *Treponema* spp. karşı tildipirosinin *in vitro* şartlarda etkili olabileceği belirlenmiştir (Angell ve ark., 2015). Koyun ve keçilerde kullanımı onaylanmamakla birlikte, etiket dışı olarak sığırlarla aynı dozda koyunlarda kullanımı ile bilgiler bulunmaktadır (Raghavan ve ark., 2016). Koyunlarda yapılan çalışmada kreatin kinaz-MB

kütle ve troponin I düzeylerinde artışlar gözlenebileceği ve doza bağlı olarak kardiyoyoksitoseye neden olabileceği ifade edilmiştir (Dik ve ark., 2017; Korkmaz, 2019).

4. Sonuç ve Öneriler

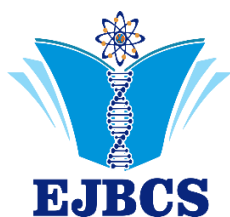
Sığır yetiştiriciliğinde BRD ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır ve sığırlarda en fazla antibiyotik kullanım gerektiren hastalıktır. Tildipirosinin hastalığa neden olan mikroorganizmalar üzerine etkinliği bilinmektedir. Ancak literatürde metafılaksi amaçlı kullanımı ile ilgili fikir birlikteliği bulunmadığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle literatürde kullanımı ile ilgili bilgiler bulunmakla birlikte veteriner hekimlikte tedaviye sunulan son makrolid antibiyotik olduğu düşünüldüğünde kullanımına dikkat edilmelidir. Akılcı antibiyotik (hedef türde, doğru hastalıkta, doğru dozda, doğru süre) kullanımı düşünüldüğünde, sadece tedavide değerlendirilmesi daha doğru olacaktır.

Klinik olarak koyunlarda bir tedavi seçeneği olarak tildipirosinin literatürde bilgileri bulunsa da farmakolojik açıdan ilk seçenek olarak asla düşünülmemelidir. Bu hayvanlarda öncelikli olarak daha alt ürünlerle tedavilere başlamalıdır. Birçok enfeksiyonda küçük ruminantlarda kullanımı onaylanmış tilozin ve/veya oksitetrasiklin gibi antibiyotiklerin oldukça etkili olabileceği unutulmamalıdır. Veteriner pratikte bu ilacın kullanımı hayvanat bahçesi gibi yerlerde bulunan çok özel türlerde özel durumların tedavisinde etiket dışına çıkılması düşünülerek uygulanmalıdır.

Kaynaklar

- Akköse M, İzci C 2017. Koyun ve keçilerde digital dermatitis. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg, 12(1):99-110.
- Anastasi E, Giguere S, Berghaus LJ, Hondalus MK, Willingham-Lane JM, MacArthur I, Cohen ND, Roberts MC, Vazquez-Boland JA 2015. Novel transferable erm(46) determinant responsible for emerging macrolide resistance in *Rhodococcus equi*. J Antimicrob Chemother, 70(12):3184-3190.
- Angell JW, Clegg SR, Sullivan LE, Duncan JS, Grove-White DH, Carter SD, Evans NJ 2015. In vitro susceptibility of contagious ovine digital dermatitis associated *Treponema* spp. isolates to antimicrobial agents in the UK. Vet Dermatol, 26(6):484-487.
- Bartram DJ, Moyaert H, Vanimisetti BH, Ramage CP, Reddick D, Stegemann MR 2016. Comparative efficacy of tulathromycin and tildipirosin for the treatment of experimental *Mycoplasma bovis* infection in calves. Vet Med Sci, 2(3):170-178.
- Berman J, Francoz D, Dubuc J, Buczinski S 2017. A randomised clinical trial of a metaphylactic treatment with tildipirosin for bovine respiratory disease in veal calves. BMC Vet Res, 13(1):176.
- Dik B, Bahcivan E, Faki HE, Uney K 2017. Tildipirosin may cause cardiotoxicity in sheep. Biomed Res, 28(19):8234-8239.
- Eckert E, Brown HE, Leslie KE, DeVries TJ, Steele MA 2015. Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage. J Dairy Sci, 98:6315-6326.
- EMA (European Medical Agency) 2020a. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/tildipirosin-bovine-caprine-porcine-species-european-public-maximum-residue-limit-assessment-report_en.pdf, (erişim tarihi:10.03.20).
- EMA (European Medical Agency) 2020b. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zuprevo-epar-summary-public_en.pdf, (erişim tarihi:10.03.20).
- Hill TM, Quigley JD, Suarez-Mena FX, Dennis TS, Schlotterbeck RL 2018. Case Study: Control of respiratory disease in male Holstein calves with tildipirosin and effect on health and growth from 0 to 4 months of age. Profes Anim Sci, 34:118-123.
- Korkmaz Y 2019. Cardiac safety of macrolide antibiotics, 6th International Conference on Sustainable Agriculture and Environment October 3-5, 2019, City of Konya - Turkey.
- Lubbers BV, Turnidge J 2015. Antimicrobial susceptibility testing for bovine respiratory disease: getting more from diagnostic results. Vet J, 203(2):149-154.
- Magalhaes LQ, Baptista AL, Fonseca PA, Menezes GL, Nogueira GM, Headley SA, Fritzen JT, Alfieri AA, Saut JPE 2017. Use of metaphylactic protocols based on the risk to develop bovine respiratory diseases in feedlot cattle. Ciencia Rural, 47(8):1-6.
- Martin M, Kleinhenz M, Kleinhenz K, Reppert E, Blasi D, Parks T, Baysinger A, Hutcheson J, Coetzee J 2020. Comparison of the effect of tildipirosin administered alone or in combination with transdermal flunixin on the performance, health, activity, and well-being of transported feedlot calves on arrival at the feedlot. Transl Anim Sci, 4:452-459.
- Martin MS, Kleinhenz M, Kleinhenz K, Reppert E, Blasi D, Parks T, Baysinger A, Hutcheson J, Coetzee J 2019. A field study to investigate the effect of Zuprevo administered alone or in combination with banamine transdermal on the health and well-being of transported feedlot calves on arrival at the feedlot. J Anim Sci, 97(Supplement 2):1-6.
- Mates CI, Spinu M, Sandru CD, Pall E, Niculae C, Niculae M 2016. Antimicrobial protocols in bovine respiratory disease complex – a review. Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara, 49(3):100-106.
- Menge M, Rose M, Bohland C, Zschiesche E, Kilp S, Metz W, Allan M, Ropke R, Nurnberger M 2012. Pharmacokinetics of tildipirosin in bovine plasma, lung tissue, and bronchial fluid (from live, nonanesthetized cattle). J Vet Pharmacol Ther, 35(6):550-559.
- Michael GB, Eidam C, Kadlec K, Meyer K, Sweeney MT, Murray RW, Watts JL, Schwarz S 2012. Increased MICs of gamithromycin and tildipirosin in the presence of the genes erm(42) and msr(E)-mph(E) for bovine *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*. J Antimicrob Chemother, 67(6):1555-1557.
- O'Connor AM, Hu D, Totton SC, Scott N, Winder CB, Wang B, Wang C, Glanville J, Wood H, White B, Larson R, Waldner C, Sargeant JM 2019. A systematic review and network meta-analysis of injectable antibiotic options for the control of bovine respiratory disease in the first 45 days post arrival at the feedlot. Anim Health Res Rev, 20(2):163-181.
- O'Connor AM, Wang C, Sargeant JM, White B, Larson R, Wang B, Waldner C, Wood H, Glanville JM 2018. What is the efficacy of metaphylaxis using antibiotics for the prevention of bovine respiratory disease in beef cattle? Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine Reports, 10.
- O'Connor AM, Yuan C, Cullen JN, Coetzee JF, da Silva N, Wang C 2016. A mixed treatment meta-analysis of antibiotic

- treatment options for bovine respiratory disease - An update. *Prev Vet Med*, 132:130-139.
- Olsen AS, Warrass R, Douthwaite S 2015. Macrolide resistance conferred by rRNA mutations in field isolates of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *J Antimicrob Chemother*, 70(2):420-423.
- Pardon B, Alliet J, Boone R, Roelandt S, Valgaeren B, Deprez P 2015. Prediction of respiratory disease and diarrhea in veal calves based on immunoglobulin levels and the serostatus for respiratory pathogens measured at arrival. *Prev Vet Med*, 120:169-176.
- Politis AP, Vasileiou NGC, Ioannidi KS, Mavrogianni VS 2019. Treatment of bacterial respiratory infections in lambs. *Small Rumin Res*, 176:70-75.
- Pyorala S, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Rantala M, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Torneke K 2014. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. *Vet J*, 200(2):230-923.
- Raghavan B, Erickson K, Kugadas A, Batra SA, Call DR, Davis MA, Foreyt WJ, Srikumaran S 2016. Role of carriers in the transmission of pneumonia in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Biol Open*, 5(6):745-755.
- Stanford K, Zaheer R, Klima C, McAllister T, Peters D, Niu YD, Ralston B 2020. Antimicrobial resistance in members of the bacterial bovine respiratory disease complex isolated from lung tissue of cattle mortalities managed with or without the use of antimicrobials. *Microorganisms*, 8(2):E288.
- Teixeira AGV, McArt JAA, Bicalho RC 2017. Efficacy of tildipirosin metaphylaxis for the prevention of respiratory disease, otitis and mortality in pre-weaned Holstein calves. *Vet J*, 219:44-48.
- Theurer ME, Fox JT, Bryant LK, Nickell LS, Hutcheson JP 2018. Treatment efficacy of tildipirosin or tulathromycin for first treatment of naturally occurring bovine respiratory disease in a commercial feedlot. *The Bovine Practitioner*, 52(2):154-159.
- Windeyer MC, Timsit E, Barkema H 2017. Bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves: Are current preventative strategies good enough? *Vet J*, 224:16-17.
- Wood ME, Fox KA, Jennings-Gaines J, Killion HJ, Amundson S, Miller MW, Edwards WH 2017. How respiratory pathogens contribute to lamb mortality in a poorly performing bighorn sheep (*ovis canadensis*) herd. *J Wildl Dis*, 53(1):126-130.
- Yazar E 2018. Veteriner İlaç ve Aşı A'dan Z'ye, Nobel tıp yayınevi, İstanbul, Türkiye.
- Yazar E, 2019. Kemoterapötikler, in: Veteriner İlaç Rehberi ve Tedavi El Kitabı, Ed: Yazar E, Nobel tıp kitabevi, İstanbul, Türkiye.
- Zhao Y, Guo L, Li J, Fang B, Huang X, 2018. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility, and pulsed-field gel electrophoresis genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink. *Can J Vet Res*, 82(4):256-263.



Archaea: an all-out study

Abolfazl Jafari-Sales¹, Majid Baseri-Salehi^{2*}

¹Department of Microbiology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

^{2*}Department of Microbiology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

*Corresponding author : majidbaseri@hotmail.com
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0003-2194-4257>

Received : 04/12/2019
Accepted : 12/04/2020

Abstract: Archaea are strange but unique beings that have evolutionary relationships with bacteria and eukaryotes and have many unique properties of genotypes and phenotypes that indicate their own evolutionary status. In addition to its presence in the human body, it plays a key role in the ecological cycle of the planet. The metabolic strategies and physiological adaptation of archaea to extreme environments are great. Accurate and Responsive Mechanisms to ensure that Taxic patterns provide the needs of the cell, or the need for Bioremediation strategies that control environmental activities, develops important features in the global ecosystem to develop tools that have great economic and health benefits for Includes human beings. This research emphasizes recent progress in recognizing archaea mechanisms and highlights new insights on structural, environmental and habitat studies.

Keywords: Archaea, Taxis, Bioremediation

© EJBCS. All rights reserved.

1. Introduction

Archaea, most of which had initially been isolated from difficult, harsh and abnormal environments, were called extremophiles playing a key role in vital processes such as carbon and nitrogen cycles (Falkowski et al., 2008, Martínez-Espinosa et al., 2011) in line with human health and modern biotechnology development. Molecular, genomic and phylogenetic data strengthen Woese's definition of archaea as the third domain of life in addition to Bacteria and Eukaryotes (Woese et al., 1990). Archaea not only exist in diverse environments, but also they can be abundant. Their predominance in marine plankton, including oceans, points to a crucial and still very poor role in the biogeochemical cycles of our planet (Keenan et al., 2001, Rothschild and Mancinelli, 2001). Evidence suggests that archaea are typically older than eukaryotes and bacteria; but, their growth rate is slower than that of eukaryotes and bacteria during evolutionary periods. However, no clear reasons have been found for the slow evolutionary rate of archaea compared to eukaryotes and bacteria, which may be related to their lives in anomalous environments (Martens-Habbena and Stahl, 2011). Although nowadays, our knowledge with regard to this group of organisms has been increased, compared to bacteria and eukaryotes, most basic processes in archaea have not been adequately characterized. For example, while

cell surfaces play a key role in cell biology of archaea, inadequate information has been remained concerning their composition, biosynthesis and function (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). The similarities of archaea to bacteria and eukaryotes have been characterized such that it is clearly evident according to the cell wall and membrane that both bacteria and archaea have a cell wall. While bacteria cell walls contain peptidoglycan compounds, archaea cell walls have either pseudopeptidoglycan or protein-based cell walls (Sleytr et al., 2014). Archaea is composed of N-Acetylglucosamine (GlcNAc) and N-Acetylglucosaminuronic acid instead of β -(4-1) and β -(3-1) (Klingl, 2014). The cytoplasm of both bacteria and archaea consists of a cytoplasmic membrane composed primarily of glycerol phosphate phospholipids that the lipid composition of these membranes is distinct and specific for each of these organisms (Jain et al., 2014). The bacteria membrane is composed of glycerol and fatty acid attached together through an ester bond; while, archaea lack fatty acids, instead they have isoprene creating much tolerance in archaea membrane. Chirality (inversion) is specific to glycerol in archaea which is in the form of sn-Glycerol-1-phosphate; while, it is sn-Glycerol-3-phosphate in bacteria and eukaryotes (Pohlschröder et al., 2005, Summons et al.,

1988). However, archaea are also significantly similar to bacteria in many respects, such as size and organization of chromosomes, the presence of polycistronic transcription units and utilization of Shine–Dalgarno sequences for the initiation of translation (Bell and Jackson, 2001, Lecompte et al., 2002, Londei, 2005).

2. Central Metabolism

Living organisms utilize nutrients both to produce the required energy for biosynthesis and other endergonic processes. The degradative metabolic pathways by which the precursors are produced for cell components are known as catabolic pathways; whereas, the biosynthetic processes are referred to as anabolic reactions (Danson, 1988, Danson, 1993). The exact nature of the catabolic and anabolic pathways is dependent on the starting nutrients and the intended cell components; the metabolic linkage between them is provided by the pathways of central metabolism, the reactions which are used as the main routes to energy generation. Therefore, this is an evident and important statement that central metabolism is vital to all activities within a cell. Moreover, due to the high importance, these pathways are found in all living organisms so that the precise details vary between organisms but the basic pattern include the majority of species (Morris et al., 1985). Glucose metabolism is performed in two groups of archaea, including extreme halophiles and thermophiles, with little variation in the pathway of Enter-doudoroff cycles. In glucose catabolism, an intermediate (2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate) or its phosphate-free form is produced and the rest of the steps are similar to those in E-D pathway in bacteria. As a result, glucose is oxidized to gluconate and then dehydrated to 2-keto-3- deoxygluconate, which in turn is phosphorylated to 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate. A modified version of Entner–Doudoroff pathway is found in other species of *Halobacterium*, *Haloferax* and *Halococcus*, that may be common for halophiles (Rawal et al., 1988, Severina et al., 1991). No route for glucose catabolism other than the modified Entner-Doudoroff pathway has been reported in halophiles. However, Tomlinson et al. have reported that pyruvate production from glucose does not need any ATP (Tomlinson and Hochstein, 1972b). Acid catabolic reactions in archaea are performed through citric acid cycle. Macromolecules' monomers in archaea are composed of intermediates like those of the pathways of bacteria metabolism (Tomlinson and Hochstein, 1972a, Tomlinson and Hochstein, 1972b). In ATP synthesis, extreme thermophiles have a-type cytochrome. Considering the location of this carrier in the metabolic membrane, organotrophy is initiated with electron reduction from the reduced substance to the electron-transport chain and is eventually transmitted to oxygen and sulfur and reduces them. The electron movement in electron transport chain (ETC) results in proton motive force formation around the membrane, which drives the synthesis of ATP via ATPase enzyme (Deppenmeier and CMLS, 2002, Gottschalk and Thauer, 2001, MÜLLER et al., 1988, Schlegel and Müller, 2013, Thauer et al., 2008). In methanogenic bacteria, and lithotrophic thermoacidophiles, CO₂ absorption occurs

through the Acetyl-CoA pathway with little modification. Obligate thermophile like thermoproteus and sulfobolus, CO₂ absorbance is done via the reverse Krebs cycle (also known as the reverse tricarboxylic acid cycle), which are also similar to green sulfur-like bacteria in this regard. *Halobacterium carbon dioxide* is obtained through the Calvin cycle (Berg et al., 2010).

Taxis in archaea

In comparison with the well-explored bacterial chemical systems, studies on archaea chemotaxis are limited. Studies have shown that several euryarchaeota display tactic behavior and respond to acetate, some amino acids or light. However, the majority of these studies seem not yet to have been accompanied with genetic or biochemical research (Migas et al., 1989, Sment and Konisky, 1989). Most of our understanding of archaea taxis has been gleaned from studies of *Halobacterium salinarum* model organism. This microbe can perform aerobic respiration, and arginine fermentation and use light as an energy source (Gonzalez et al., 2009). The organism requires pumps bacteriorhodopsin (BR) and halorhodopsin (HR) that which have a role in ion exchange (Oesterhelt and Tittor, 1989). As a result, the mentioned different growth strategies, *H. salinarum* can react to different stimuli such as light, oxygen, amino acids and sensitive membrane potential (Kokoeva and Oesterhelt, 2000, Kokoeva et al., 2002, Seidel et al., 1995, Spudich et al., 1988, Yao and Spudich, 1992). *H. salinarum* contains 18 different MCP homologs named Halobacterial transducer proteins (Htrs), which possess their own sensing domain and interact with other receptor proteins (Koch et al., 2008). HtrI and HtrII have phototaxis reaction ((Spudich et al., 1988, Yao and Spudich, 1992). Htr8 and Htr10 (HemAT) require oxygen for absorption and phobic reactions ((Brooun et al., 1998, Hou et al., 2000). Htr14 (MpcT) can detect changes in membrane potential (Koch and Oesterhelt, 2005); while, Htr11 (Car) has cytosolic activity (Storch et al., 1999). Htr3 (BasT) is responsible for detection of branched chain and sulfur-containing amino acids and Htr5 (CosT) mediates osmolytes compatibility (Kokoeva and Oesterhelt, 2000, Kokoeva et al., 2002). Phototaxis offers boundless experimental possibilities. In comparison with chemical stimuli, a light stimulus can be instantly switched on and off, allowing for formation of a dynamic range, duration of the stimulus as well as its intensity. This phototactic response has been studied and is considered as one of the applications in biology programs (Nutsch et al., 2003, Streif et al., 2010).

Bioremediation via archaea

Bioremediation is the use of microorganisms for degradation or removal of contaminants. Most bioremediation research have focused on the processes performed by the domain bacteria; however, the specified archaea play an important role in many situations. In extreme conditions, such as halophilic or acidophilic environments, archaea are well suited for bioremediation. Archaea play a role in halophilic hydrocarbon degradation, acidophilic hydrocarbon degradation, hydrocarbon degradation in impenetrable environments such as soils and

oceans, metal refining, and acid mine drainage (Hazen et al., 2016, Lefebvre and Moletta, 2006, SINGH et al.).

Pathogenic potential of archaea

Currently, research reveals that archaea are able to survive in the human body. However, the efforts made to prove the pathogenic potential of archaea in humans have not been successful by 2011 (Relman et al., 2000). Pathogenesis depends on host cell entry, growth, proliferation, use of host system tools and host immune system. Archaea will follow this pattern if they behave as pathogens (Eckburg et al., 2003). Microbiologists often do not prioritize archaea in clinical practices, because these organisms have been known as exotic extremophiles that have strange molecular machinery. Since archaea have been known to be methanogens associated with the human gut for several decades, human clinical studies may reveal new aspects of archaea-human interactions. Therefore, today SrRNA16 genes can be used to fully identify pathogenic factors in humans (Walters et al., 2011). By investigating the human colon content, researchers assigned about 0.8% of the genes to archaea which are in methanogen form (Fricke et al., 2006, Qin et al., 2010). Thus, these gene transmissions have made them resistant and present in the human colon. *M. smithii*, *M. Stadtmanae*, *Methanomassiliicoccus luminyensis* and *Candidatus Methanomethylphilus alvus* are examples of these organisms that are mostly found in the patients with intestinal inflammation ((Bang et al., 2014, Lecours et al., 2014). Intestinal methanogens play a role in human obesity and chronic constipation (Samuel and Gordon, 2006, Turnbaugh et al., 2006). Archaea have also been detected to play a role in the formation of dental plaques (Brusa et al., 1987) and are found on the surface of human skin (al., 2012, Oh et al., 2014).

Conclusion

The study of archaea has confirmed the initial predictions by Woese suggesting that archaea will exhibit a phenotypic diversity at least comparable to that of bacteria and that archaea will be characterized by unique features at the molecular level. In addition, it was revealed that archaea play a special role in bioremediation and are present in human host. Given the extreme climate nature of many archaea, the gradual survival strategies of these microorganisms seem considerable.

Reference

Bang C, Weidenbach K, Gutschmann T, Heine H, Schmitz RA 2014. The intestinal archaea *Methanosphaera stadtmanae* and *Methanobrevibacter smithii* activate human dendritic cells. *PLoS one*, 9(6):e99411.

Bell SD, Jackson SP 2001. Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr Opin Microbiol*, 4(2):208-13.

Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Hügler M, Alber BE, Fuchs G 2010. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Microbiol*, 8(6):447-60.

Brooun A, Bell J, Freitas T, Larsen RW, Alam M 1998. An archaeal aerotaxis transducer combines subunit I core structures of eukaryotic cytochrome c oxidase and eubacterial methyl-accepting chemotaxis proteins. *J bacteriol*, 180(7):1642-6.

Brusa T, Conca R, Ferrara A, Ferrari A, Pecchioni A 1987. The presence of methanobacteria in human subgingival plaque. *J Clin Periodontol.*, 14(8):470-1.

Danson MJ 1988. Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv Microb Physiol*, 29: 165-231. Academic Press.

Danson MJ 1993. Central metabolism of the archaea. In *New Comprehensive Biochemistry*, 26:1-24. Elsevier.

Deppenmeier U 2002. Redox-driven proton translocation in methanogenic Archaea. *Cell Mol Life Sci*, 59(9):1513-33.

Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA 2003. Archaea and their potential role in human disease. *Infect Immun*, 71(2):591-6.

Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879):1034-9.

Fricke WF, Seedorf H, Henne A, Krüer M, Liesegang H, Hedderich R, Gottschalk G, Thauer RK 2006. The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *J Bacteriol*, 188(2):642-58.

Gonzalez O, Gronau S, Pfeiffer F, Mendoza E, Zimmer R, Oesterhelt D 2009. Systems analysis of bioenergetics and growth of the extreme halophile *Halobacterium salinarum*. *PLoS Comput Biol*, 5(4).

Gottschalk G, Thauer RK 2001. The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1505(1):28-36.

Hazen TC, Prince RC, Mahmoudi N 2016. "Marine oil biodegradation, 2121-2129. ACS Publications.

Hou S, Larsen RW, Boudko D, Riley CW, Karatan E, Zimmer M, Ordal GW, Alam M 2000. Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria. *Nature*, 403(6769):540-4.

Hulcr J, Latimer AM, Henley JB, Rountree NR, Fierer N, Lucky A, Lowman MD, Dunn RR 2012. A jungle in there: bacteria in belly buttons are highly diverse, but predictable. *PLoS one*, 7(11).

Jain S, Caforio A, Driessen AJ 2014. Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Front Microb*, 5:641.

Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P 2001. The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem*, 70(1):755-75.

Klingl A 2014. S-layer and cytoplasmic membrane—exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes. *Front Microb*, 5:624.

Koch MK, Oesterhelt D 2005. MpcT is the transducer for membrane potential changes in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol*, 55(6):1681-94.

Koch MK, Staudinger WF, Siedler F, Oesterhelt D 2008. Physiological sites of deamidation and methyl esterification in sensory transducers of *Halobacterium salinarum*. *J Mol Biol*, 380(2):285-302.

Kokoeva MV, Oesterhelt D 2000. BasT, a membrane-bound transducer protein for amino acid detection in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microb*, 35(3):647-56.

Kokoeva MV, Storch KF, Klein C, Oesterhelt D 2002. A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids. *EMBO*, 21(10):2312-22.

Lecompte O, Ripp R, Thierry JC, Moras D, Poch O 2002. Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res*, 30(24):5382-90.

Lecours PB, Marsolais D, Cormier Y, Berberi M, Haché C, Bourdages R, Duchaine C 2014. Increased prevalence of

- Methanosphaera stadtmanae in inflammatory bowel diseases. *PLoS One*, 9(2).
- Lefebvre O, Moletta R 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water research*, 40(20):3671-82.
- Londei P 2005. Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. *FEMS Microbiol Rev*, 29(2):185-200.
- Martens-Habbena W, Stahl DA 2011. Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia-oxidizing archaea. *Methods Enzymol*, 496: 465-487. Academic Press.
- Martínez-Espinosa RM, Cole JA, Richardson DJ, Watmough NJ 2011. Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem Soc Trans*, 39 (1): 175-178.
- Migas J, Anderson KL, Cruden DL, Markovetz AJ 1989. Chemotaxis in *Methanospirillum hungatei*. *Appl Environ Microbiol*, 55(1):264.
- Morris JG 1985. Anaerobic metabolism of glucose. *Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine*, 1:357-78.
- Müller V, Wanner C, Gottschalk G 1988. Electron-transport-driven sodium extrusion during methanogenesis from formaldehyde and molecular hydrogen by *Methanosarcina barkeri*. *FEBS J*, 178(2):519-25.
- Nutsch T, Marwan W, Oesterhelt D, Gilles ED 2003. Signal processing and flagellar motor switching during phototaxis of *Halobacterium salinarum*. *Genome research*, 13(11):2406-12.
- Oesterhelt D, Tittor J 1989. Two pumps, one principle: light-driven ion transport in halobacteria. *Trends Biochem Sci*, 14(2):57-61.
- Oh J, Byrd AL, Deming C, Conlan S, Barnabas B, Blakesley R, Bouffard G, Brooks S, Coleman H, Dekhtyar M, Gregory M 2014. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*, 514(7520):59-64.
- Pohlschröder M, Giménez MI, Jarrell KF 2005. Protein transport in Archaea: Sec and twin arginine translocation pathways. *Curr Opin Microbiol*, ;8(6):713-9.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285):59-65.
- Rawal N, Kelkar SM, Altek W 1988. Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaeobacteria. *Indian J Biochem Biophys*, 25(6):674-86
- Relman DA, Falkow S 2000. A molecular perspective of microbial pathogenesis. *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill living stone.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823):1092-101.
- Samuel BS, Gordon JI 2006. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci*, 103(26):10011-6.
- Schlegel K, Müller V 2013. Evolution of Na⁺ and H⁺ bioenergetics in methanogenic archaea. *Biochem Soc Trans*, 41(1).
- Seidel R, Scharf B, Gautel M, Kleine K, Oesterhelt D, Engelhard M 1995. The primary structure of sensory rhodopsin II: a member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of rhodopsin II. *Proc Natl Acad Sci*, 92(7):3036-40.
- Severina LO, Pimenov NV, Plakunov VK 1991. Glucose transport into the extremely halophilic archaeobacteria. *Arch Microbiol*, 155(2):131-6.
- Singh M, Srivastava PK, Jaiswal VK, Kharwar RN 2017. Biotechnological applications of microbes for the remediation of environmental pollution. *Enviro Protec*, 1:3.
- Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D 2017. S-layers: principles and applications. *FEMS microbiol rev*, 38(5):823-64.
- Sment KA, Konisky JO 1989. Chemotaxis in the archaeobacterium *Methanococcus voltae*. *J bacteriol*, 171(5):2870-2.
- Spudich EN, Hasselbacher CA, Spudich JL 1988. Methyl-accepting protein associated with bacterial sensory rhodopsin I. *J bacteriol*, 170(9):4280-5.
- Storch KF, Rudolph J, Oesterhelt D 1999. Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *EMBO*, 18(5):1146-58.
- Streif S, Oesterhelt D, Marwan W 2010. A predictive computational model of the kinetic mechanism of stimulus-induced transducer methylation and feedback regulation through CheY in archaeal phototaxis and chemotaxis. *BMC systems biology*, 4(1):27.
- Summons RE, Powell TG, Boreham CJ 1988. Petroleum geology and geochemistry of the Middle Proterozoic McArthur Basin, Northern Australia: III. Composition of extractable hydrocarbons. *Geochim Cosmochim Acta*, 52(7):1747-63.
- Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol*, 6(8):579-91.
- Tomlinson GA, Hochstein LI 1972. Isolation of carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacteria. *Can J Microbiol*, 18(5):698-701.
- Tomlinson GA, Hochstein LI 1972. Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria. *Canb J Microbiol*, 18(12):1973-6.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122):1027.
- Walters WA, Caporaso JG, Lauber CL, Berg-Lyons D, Fierer N, Knight R 2011. PrimerProspector: de novo design and taxonomic analysis of barcoded polymerase chain reaction primers. *Bioinformatics*, 27(8):1159-61.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci*, 87(12):4576-9.
- Yao VJ, Spudich JL 1992. Primary structure of an archaeobacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. *Proc Natl Acad Sci*, 89(24):11915-9.
- Zaremba-Niedzwiedzka K, Caceres EF, Saw JH, Bäckström D, Juzokaite L, Vancaester E, Seitz KW, Anantharaman K, Starnawski P, Kjeldsen KU, Stott MB 2017. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* 541(7637):353-8.



EJBCS